

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ÇOCUK HEMATOLOJİ BİLİM DALI

BETA TALASEMİLİ ÇOCUKLARDA
OKSİDAN-ANTIOKSİDAN SİSTEM VE LENFOSİT DNA HASARI

DR. MURAT SÖKER
(YAN DAL UZMANLIK TEZİ)

TEZ YÖNETİCİSİ
PROF. DR. AHMET KOÇ

ŞANLIURFA
2008

ÖNSÖZ

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Hematoloji Bilim Dalı'nda Çocuk Hematoloji Yan Dal Uzmanlık Eğitimim süresince her konuda desteğini ve bilgilerini esirgemeyen, tez çalışmalarında çok büyük emeği ve desteği olan Değerli Hocam Prof.Dr.Ahmet Koç'a ; Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri, araştırma görevlileri, hemşire ve personeline sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımdaki yardım ve desteklerinden dolayı Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki sevgili hocalarım Prof.Dr.Özcan Erel ve Prof.Dr.Abdurrahim Koçyiğit'e, Öğ.Gör.Hakim Çelik, Biy. Abdullah Taşkın ve Biyokimya Anabilim Dalı personeline ayrıca teşekkür ederim.

Yan Dal Uzmanlık Eğitimim süresince desteğini ve özverisini esirgemeyen sevgili eşime,canım oğullarım Ali ve Eren'e, dualarını eksik etmeyen annem ve kardeşlerime en içten dileklerle teşekkür eder, sevgilerimi sunarım.

Prof. Dr. Murat Söker

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II-III
TABLOLAR DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	IV-V
SİMGE VE KISALTMALAR	VI-VII
ÖZET	VIII-IX
ABSTRACT	X-XI
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1-2
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Talasemiler	3
2.1.1. β -Talasemiler	3-5
2.1.1.1. β -Talasemi Major (Homozigot β talasemi)	5-6
2.1.1.1.1. Fizyopatoloji	6-7
2.1.1.1.2. Klinik	7-8
2.1.1.1.3. Laboratuvar	8-9
2.1.1.1.4. Tedavi	9-12
2.1.1.1.5. Prognoz	12
2.1.1.1.6. Talasemi kontrol programı (Taşıyıcıların saptanması ve prenatal tanı)	12-13
2.1.1.2. β -Talasemi intermedia	13-14
2.1.1.3. β -Talasemi minör (β -talasemi taşıyıcılığı, talasemi trait)	14
2.1.2. α -Talasemiler	14-15
2.2. Oksidatif Stres ve Total Antioksidan Kapasite	16
2.2.1. Serbest Oksijen Radikalleri	16-18
2.2.1.1. Süperoksit Radikali	18
2.2.1.2. Hidrojen Peroksit	18-19
2.2.1.3. Hidroksil Radikali	19
2.2.1.4. Singlet Oksijen	19-20
2.2.2. Serbest Oksijen Radikallerinin Hücrelere Olan Zararlı Etkileri	20
2.2.2.1. Membranların Lipid Peroksidasyonu	20-21

2.2.2.2. Proteinlerin Oksidatif Modifikasyonu	21
2.2.2.3. Karbonhidratlara Etkileri	21
2.2.2.4. Oksidatif Stres ve DNA Lezyonları	22-23
2.2.3. Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Savunma Mekanizmaları	23
2.2.3.1. Antioksidan Sistemler	23-25
2.2.3.2. Enzimatik Antioksidanlar	25-26
2.2.3.3. Enzimatik Olmayan Antioksidan Savunma Sistemleri	26-27
2.2.4. Total Antioksidan Kapasite	28
2.3. Talasemi ve Oksidatif Stres	28-29
2.4. Talasemi ve Demir Toksisitesi	29-31
2.5. Talasemi ve Lipid Peroksidasyonu	31-32
2.6. Talasemi ve DNA Hasarı	32
3. MATERYAL VE METOD	33
3.1. Örneklerin Hazırlanması ve Ölçümler	33-34
3.2. Mononükleer Lökositlerin Seperasyonu	34
3.3. Comet Assay (alkali mononükleer hücre elektroforezi) Yöntemi ile DNA Hasar Tayini (mDNA hasarı)	34-36
3.4. Total Antioksidan Kapasite (TAK)	36
3.5. Total Oksidant Seviye (TOS)	36-37
3.6. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)	37
3.7. Lipid hidroperoksidasyonu (LOOH)	37
3.8. İstatistiksel Analiz	37
4. BULGULAR	38-53
5. TARTIŞMA	54-64
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	65
7. KAYNAKLAR	66-77

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. β -Talasemide kalıtım.	4
Tablo 2. β -Talasemi taşıyıcılığı ve demir eksikliği anemisi ayırıcı tanısı.	14
Tablo 3. Reaktif oksijen partiküllerinin kaynakları.	17
Tablo 4. β -TM ve kontrol grubumuzun yaş, cinsiyet ve BMI değerleri dağılımı.	38
Tablo 5. β -TM'lü olgularımızın klinik karakteristikleri ve transfüzyon özellikleri.	39
Tablo 6. β -TM ve kontrol grubumuzun bazı biyokimyasal kan parametreleri.	39
Tablo 7. β -TM'lü olgularımızın şelasyon tedavilerine göre dağılımı.	40
Tablo 8. β -TM ve kontrol grubu olgularımızın DNA hasarı ve oksidatif stres parametrelerin karşılaştırılması.	40
Tablo 9. β -TM'lü hastalarımızın DNA hasarı, oksidan-antioksidan sistem ve bazı biyokimyasal değerler ile transfüzyon alma sürelerine ait korelasyon değerleri.	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. Olgularımızın DNA'larında ki farklı derecedeki hasarların elektroforez migrasyonu sonrası flouresan mikroskop görüntüleri.	41
Şekil 2. β -TM'lü hasta ve kontrol grublarının DNA hasarı düzeyleri.	42
Şekil 3. β -TM'lü hasta ve kontrol grublarının TOS düzeyleri.	42
Şekil 4. β -TM'lü hasta ve kontrol grublarının TAK düzeyleri.	43
Şekil 5. β -TM'lü hasta ve kontrol grublarının OSİ düzeyleri.	43
Şekil 6. β -TM'lü hasta ve kontrol grublarının LOOH düzeyleri.	44
Şekil 7. β -TM'lü olgularımızın serum demir düzeyi ile DNA hasarı korelasyon grafiği.	47
Şekil 8. β -TM'lü olgularımızın serum demir düzeyi ile TOS arasındaki korelasyon grafiği.	47
Şekil 9. β -TM'lü olgularımızın serum demir düzeyi ile TAK arasındaki korelasyon grafiği.	47
Şekil 10. β -TM'lü olgularımızın serum demir düzeyi ile OSİ arasındaki korelasyon grafiği.	47

Şekil 11. β -TM'lü olgularımızın serum demir düzeyi ile AST arasındaki korelasyon grafiği.	48
Şekil 12 . β -TM'lü olgularımızın serum demir düzeyi ile ALT arasındaki korelasyon grafiği.	48
Şekil 13. β -TM'lü olgularımızın serum demir düzeyi ile transfüzyon süresi arasındaki korelasyon grafiği.	48
Şekil 14 . β -TM'lü olgularımızın serum ferritin düzeyi ile DNA hasarı korelasyon grafiği.	49
Şekil 15 . β -TM'lü olgularımızın serum ferritin düzeyi ile TOS arasındaki korelasyon grafiği.	49
Şekil 16. β -TM'lü olgularımızın serum ferritin düzeyi ile TAK arasındaki korelasyon grafiği.	49
Şekil 17. β -TM'lü olgularımızın serum ferritin düzeyi ile OSİ arasındaki korelasyon grafiği.	49
Şekil 18. β -TM'lü olgularımızın serum ferritin düzeyi ile LOOH arasındaki korelasyon grafiği.	50
Şekil 19. β -TM'lü olgularımızın serum ferritin düzeyi ile AST arasındaki korelasyon grafiği.	50
Şekil 20. β -TM'lü olgularımızın serum ferritin düzeyi ile ALT arasındaki korelasyon grafiği.	50
Şekil 21. β -TM'lü olgularımızın ferritin düzeyi ile transfüzyon süresi korelasyon grafiği.	50
Şekil 22. β -TM'lü olgularımızın DNA hasarı ile TOS arasındaki korelasyon grafiği.	51
Şekil 23. β -TM'lü olgularımızın DNA hasarı ile TAK arasındaki korelasyon grafiği.	51
Şekil 24. β -TM'lü olgularımızın DNA hasarı ile OSİ arasındaki korelasyon grafiği.	51
Şekil 25. β -TM'lü olgularımızın DNA hasarı ile LOOH arasındaki korelasyon grafiği.	51
Şekil 26. β -TM'lü olgularımızın DNA hasarı ile AST arasındaki korelasyon grafiği.	52
Şekil 27. β -TM'lü olgularımızın DNA hasarı ile ALT arasındaki korelasyon grafiği.	52
Şekil 28 . β -TM'lü olgularımızın TOS ile ALT arasındaki korelasyon grafiği.	52
Şekil 29. β -TM'lü olgularımızın TAK ile ALT arasındaki korelasyon grafiği.	52
Şekil 30. β -TM'lü olgularımızın OSİ ile ALT arasındaki korelasyon grafiği.	53
Şekil 31. β -TM'lü olgularımızın transfüzyon süresi ile ALT arasındaki korelasyon grafiği.	53
Şekil 32. β -TM'lü olgularımızın transfüzyon süresi ile AST arasındaki korelasyon grafiği.	53

SİMGE VE KISALTMALAR

AU	: Arbitrary Unit
ALA	: Aminolevülinik asit
Ark	: Arkadaşları
BK	: Beyaz küre
BMI	: Vücut Kitle İndeksi
CAT	: Katalaz
Ca	: Kalsiyum
CD	: Conjugated diene
Cu	: Bakır
DFO	: Desferrioksamine
DFP	: Deferiprone
DNA	: Deoksiribonükleik asit
Fe	: Demir
FeNTA	: Ferric nitrilotriacetate
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GSH	: Glutasyon
GST	: Glutasyon transferaz
Hb	: Hemoglobin
HDL-Kol	: Yüksek Dansiteli lipoprotein-Kolesterol
HH	: Herediter hemikromatoz
HLA	: Human Lökosit Antijen
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
HO [·]	: Hidroksil Radikali
HOCl	: Hipoklorid
HO ₂ [·]	: Perhidroksil radikali
IVS	: Intervening sequences
KC	: Karaciğer
LDH	: Laktik Dehidrogenaz
LDL-Kol	: Düşük dansiteli lipoprotein-Kolesterol
MCHC	: Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration

MCV	: Ortalama Eritrosit Hacmi
MDA	: Malondialdehit
MI	: Mentzer indeksi
mRNA	: Messenger Ribonükleik asit
NO _x	: Nitrik oksit
NTBI	: Non transferrin bound serum iron
OEHb	: Ortalama eritrosit Hemoglobini
OSİ	: Oksidatif Stres İndeksi
O ₂ ^{↑↓}	: Singlet Oksijen
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PUFA	: Poliansature yağ asiti
RDW	: Red cell distribution width
RES	: Retikuloendotelial Sistem
ROO	: Peroksil radikali
RCOO	: Organik peroksit radikali
RO	: Alkoksil radikali
SOD	: Süperoksit dismutaz
SQUID	: Superconducting susceptometry
O ₂ ⁻	: Süperoksit radikali
TAK	: Total Antioksidan Kapasite
TI	: Talasemi intermedia
TBARS	: Thiobarbituric acid reactive substances
TG	: Trigliserid
TRAP	: Total peroxy radical-trapping antioxidant parameter
TM	: Talasemi Major
TOS	: Total Oksidant Seviye
Vit	: Vitamin
β	: Beta
α	: Alfa
λ	: Lambda
γ	: Gamma

ÖZET

BETA TALASEMİLİ ÇOCUKLARDA OKSİDAN-ANTIOKSİDAN SİSTEM VE LENFOSİT DNA HASARI

Talasemi; inefektif eritropoez, hemoliz ve anemi temelinde metabolik düzensizlik, demir yüklenmesi, kronik hipoksi ve hücre hasarının eklendiği otozomal resesif geçişli bir hemoglobinopatidir. Oksidatif stres; kardiyovasküler hastalıklar, kanser, renal, infeksiyon ve nörolojik hastalıklarda olduğu gibi β -talasemi majorlü (TM) hastalarda da son zamanlarda araştırılmaktadır. Oksidatif stres, pro-oksidanların yapımı ve nötralizasyonu arasındaki dengesizlik sonucu oluşur. Pro-oksidan / antioksidan dengede bozulma hücresel yapılarda oksidatif strese ve DNA hasarına neden olabilir.

Bu çalışmada transfüzyon bağımlı β -TM'lü hastalarda oksidan / antioksidan sistem ve DNA hasarı oluşumunu değerlendirmek amaçlandı. Aynı zamanda saptanan değişikliklerin demir yükü ile ilişkisi araştırıldı. Yaş ortalaması $7,34 \pm 4,21$ yıl arasında değişen 83 transfüzyon bağımlı β -TM hasta grubumuzu oluşturdu. Aynı yaş ve cinsiyette 40 anemik olmayan sağlıklı çocuk kontrol grubu olarak alındı. DNA hasarı comet assay yöntemiyle, total oksidan seviye (TOS) ve total antioksidan kapasite (TAK) ise Erel yöntemiyle ölçüldü.

Hasta grubumuzda, DNA hasarı: $10,65 \pm 6,58$ AU, TOS: $15,98 \pm 9,44$ ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eqv./L), TAK: $1,62 \pm 0,27$ (mmol Trolox Eqv./L), Oksidatif Stres İndeksi (OSİ): $11,11 \pm 8,42$ AU ve lipid hidroperoksid (LOOH): $5,44 \pm 1,80$ ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eqv./L) olarak saptandı. Kontrol grubumuzda, DNA hasarı: $1,45 \pm 2,02$ AU, TOS: $7,18 \pm 3,74$ ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eqv./L), TAK: $1,76 \pm 0,38$ (mmol Trolox Eqv./L), OSİ: $4,66 \pm 3,46$ AU ve LOOH: $2,44 \pm 0,86$ ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eqv./L) olarak saptandı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında β -TM'lü hastalarda DNA hasarının artmış olduğu saptandı ($p < 0,001$). Oksidan-antioksidan sistem değerlendirildiğinde hasta grubumuzda TOS, OSİ ve LOOH düzeylerinin kontrol grubuna göre arttığı, TAK'in ise azaldığı saptandı (sırasıyla $p < 0,001$; $p < 0,001$; $p < 0,001$ ve $p = 0,018$). β -TM'lü olgularımızda serum ferritin düzeyi ile sırasıyla DNA hasarı, TOS, OSİ ve LOOH arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon; TAK ile istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon saptandı. β -TM'lü olgularımızda serum demir ve ferritin düzeyleri ile AST, ALT ve transfüzyon yılı arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon; TOS ve OSİ ile ALT arasında pozitif korelasyon, TAK ile ALT arasında ise negatif korelasyon; serum AST ve ALT düzeyleri ile transfüzyon yılı arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptandı. Aynı zamanda β -

TM'lü olgularımızda DNA hasarı ile sırasıyla TOS, OSİ, LOOH, AST ve ALT arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon, TAK ile istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon saptandı.

Sonuç olarak; β -TM'lü hastalarda demir bağımlı oksidatif stres artışı ve beraberinde DNA hasarı oluşmaktadır. Doğal veya sentetik antioksidanların kullanımıyla beraber etkili demir şelatör tedavilere ağırlık verilmesinin oksidatif stresi ve DNA hasarını azaltabileceği düşüncesindeyiz.

Anahtar Kelimeler: β -Talasemi, Oksidan-Antioksidan Sistem, DNA Hasarı.

ABSTRACT

OXIDANT-ANTIOXIDANT SYSTEM AND LYMPHOCYTE DNA DAMAGE IN BETA THALASSEMIA CHILDREN

Thalassemia is an autosomal recessively inherited hemoglobinopathy which basically characterised by ineffective erythropoiesis, hemolysis and anemia. Metabolic disorders, iron overload, chronic hypoxia and cell damage are added to these findings. Oxidative stress is recently being investigated in β -thalassemia major (TM) patients as well as in cardiovascular diseases, cancer, renal diseases, infection and neurological diseases. Oxidative stress develops as a result of imbalance between formation and neutralisation of pro-oxidants. Pro-oxidant / antioxidant equilibrium disorders may cause oxidative stress and DNA damage in cellular structures.

The aim of this study was to detect and correlate iron overload with the oxidant / antioxidant status and DNA damage in transfusion dependent β -TM patients. The patient group was constituted from 83 patients with transfusion dependent β -TM whose mean age was $7,34 \pm 4,21$ years. 40 sex and age-matched children with non-anemia, served as control group. The damage of mononuclear DNA were assessed with comet assay method and total oxidant status (TOS) and total antioxidant capacity (TAC) measurement by using Erel's methods.

In the β -TM patients, mean DNA damage level was $10,65 \pm 6,58$ AU, mean TOS level was $15,98 \pm 9,44$ ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eqv./L), mean TAK level was $1,62 \pm 0,27$ (mmol Trolox Eqv./L), mean Oxidative Stress Index (OSI) level was $11,11 \pm 8,42$ AU and mean lipid hydroperoxide (LOOH) level was $5,44 \pm 1,80$ ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eqv./L) detected. In control group, mean DNA damage level was $1,45 \pm 2,02$ AU, mean TOS level was $7,18 \pm 3,74$ ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eqv./L), mean TAK level was $1,76 \pm 0,38$ (mmol Trolox Eqv./L), mean OSI level was $4,66 \pm 3,46$ AU and mean LOOH level was $2,44 \pm 0,86$ ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eqv./L) detected. When compared to the controls, DNA damage was detected to be increased in β -TM patients ($p < 0,001$). When oxidant-antioxidant system were evaluated, while TOS, OSI and LOOH levels were significantly increased, TAC levels were decreased in β -TM patients compared to controls ($p < 0,001$; $p < 0,001$; $p < 0,001$ and $p = 0,018$ respectively). There was a statistically significant positive correlation between serum ferritin levels and DNA damage, TOS, OSI and LOOH; however a negative correlation was observed between serum ferritin and TAC levels in the β -TM patients. There was a statistically significant positive correlation between the serum iron and ferritin levels and AST, ALT

and transfusion years in the β -TM patients. TOS and OSI levels were positively correlated with ALT, however a negative correlation was observed between TAC and ALT levels in the β -TM patients. Serum AST and ALT levels were detected to have a statistically significant positive correlation with transfusion years in the β -TM patients. In the β -TM patients the DNA damage was detected to have a statistically significant positive correlation with TOS, OSI, LOOH, AST and ALT respectively; however a negative correlation was observed between DNA damage and TAC levels.

In conclusion; there were increased iron dependent oxidative stress and DNA damage present in patients with β -TM. The combination of effective iron-chelatory agents with natural or synthetic antioxidants can be very helpful in the clinical practice and in decrease of the oxidant stress and DNA damage of patients with β -TM.

Key Words: β -Thalassemia, Oxidant-Antioxidant System, DNA Damage.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Talasemi; genetik bir mutasyon sonucu, Hemoglobin (Hb) yapısında yer alan globin zincir sentezinin kantitatif bozukluğu ile karakterize, hafif-ağır hipokrom mikrositer bir anemiyle giden, otozomal resesif geçişli tek gen hastalığıdır. Sentezi bozulan globin zinciri talasemiye adını verir. Hemoglobin yapısındaki β -globin zincirinin azalmış veya bozulmuş biyosentezi, yapımı normal hızda olan ve tutulmayan alfa globin zincirlerinin hücre içi dengesiz birikimine yol açar. β -talasemi sendromunda; dolaşımdaki eritrositlerin prematür hemolizi ve ineffektif eritropoez, aneminin başlıca sebebidir (1-6).

Değişik birçok reaksiyonla hücre ve dokularda oluşabilen ve oksijenden tek elektron indirgenmesi sonucu oluşan serbest radikaller; proteinler, lipitler, karbonhidratlar ve nükleik asitleri yıkıma uğratabilir. Poliansature yağ asitlerinin oksidatif yıkımı olan lipit peroksidasyonu serbest radikallerin uyardığı hücre yıkımında önemli bir mekanizmadır. Birçok hastalıkta doku yıkımı serbest radikaller ve lipit peroksidasyonu sonucu oluşur. Organizmadaki serbest radikal reaksiyonları, radikal oluşumunu önleyen veya zincir kıran yapılar olarak işlev gören birçok antioksidan sistem ile kontrol edilir (7,8). Pro-oksidan/Antioksidan dengede bozulma hücrel yapılar da oksidatif hasara ve DNA’da kırıklara neden olabilir.

β -talasemili hastalarda α -globin zincirlerinin hücre içi birikimi eritrosit membran proteinlerinde oksidatif hasara neden olabilir. Aynı zamanda bu hastalarda gerek ineffektif eritropoezise bağlı demir absorpsiyonunun artması, gerekse de tedavi amacı ile uygulanan multipl kan transfüzyonu demir yüklenmesine, sekonder olarak peroksidatif doku hasarı ve sonuçta oksidatif strese neden olabilmektedir (9,10). Kısaca talasemili hastalarda; serbest radikallerle oluşan oksidatif hasar, lipid peroksidasyonu, artmış demir toksisitesi nedeni ile eritrositlerin oksidatif streslere artmış duyarlılığı ile oksidatif stres oluşabilmektedir (11). Talasemi patofizyolojisinde önemli rol oynadığı düşünülen demir bağımlı oksidatif stresin temelde “Fenton Kimyası” hipotezine göre oluştuğu ve DNA hasarına neden olabileceği ifade edilmektedir(10,12). Talasemili hastalarda özellikle tedavi amacıyla verilen düzenli eritrosit transfüzyonu ile oluşan demir yükünü azaltmak için vücuttan demir uzaklaştırıcı şelatörler rutin olarak kullanılır.

Comet assay (alkali hücre elektroforezi) genotoksisiteyi değerlendirmede ve hücre düzeyinde DNA hasarını saptamada güvenilirliği kanıtlanmış, uygulaması kolay ve sade bir yöntemdir. β -Talasemi Majörlü (TM) hastalarda oksidan / antioksidan sistem muhtelif çalışmalarda değerlendirilmiş olmasına rağmen DNA hasarı düzeyi hakkında çalışmalar henüz çok yenidir (9,10,12).

Bu çalışmamızda amaç; transfüzyona bağımlı β -talasemili hastalarda oksidan ve antioksidan sistemi ve olası DNA hasarını değerlendirmek ve demir yüklenmesini gösteren parametreler ile ilişkisini incelemektir. Çalışma sonuçlarının; demir şelatör çalışmalara, kanser önleme çalışmalarına, talasemili hastaların yaşam kalitelerini artıracak çalışmalara yol göstereceği inancındayız.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Talasemiler

Hemoglobinopatiler dünyada en sık görülen monojenik hematolojik hastalıklardandır. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre taşıyıcı sıklığı %7'dir. Her yıl dünyamızda 300.000 - 500.000 arasında hemoglobinopatili çocuk doğmaktadır (4). Normal Hb molekülleri içerdikleri globin zincirlerine göre, HbA ($\alpha_2\beta_2$), HbA₂ ($\alpha_2\lambda_2$) ve HbF ($\alpha_2\gamma_2$) olarak adlandırılırlar (5). Normal bir yetişkinde, Hb'in %96-98'ini HbA, %1.5-3.2'sini HbA₂ ve %0.6-0.8'ini HbF oluşturmaktadır (5). Globin peptidlerinin sentezinde yetersizlik (α ve β -talasemi), ile β globin zincirinde yapısal mutasyonlar (HbS, HbC, HbE) en sık görülen hemoglobinopatileri oluşturur (3).

Talasemi sendromları, genetik bir mutasyon sonucu, Hb yapısında yer alan α , β , γ , λ gibi globin peptidlerinden birinin veya daha fazlasının sentezinin azalması veya tamamen durması sonucu, hafif veya ağır hipokrom mikrositer bir anemiyle giden, otozomal ressesif geçişli bir grup Hb bozukluğu hastalığıdır. Genetik mutasyon sonucu etkilenen gende mRNA yapımı tamamen durabilir, fonksiyonel olmayan bir mRNA ortaya çıkabilir, ya da çabuk degrade olan unstabil bir mRNA sentezlenebilir. Sonuçta genin kodladığı globin zincirinin sentezi azalır (13). Talasemi, sentezi bozulan globin zincirinin ismi ile adlandırılırlar. Örneğin; α -talasemi, β -talasemi, $\lambda\beta$ talasemi, $\gamma\lambda\beta$ talasemi gibi. Erişkinde major Hb'nin HbA olması nedeniyle klinik olarak önemi olanlar, α ve β globin zinciri ile ilgili olan α -talasemiler ve β -talasemilerdir. En sık görülen tiplerde yine α ve β talasemilerdir. Hiç bir zaman α ve β zincirinin beraber yokluğu görülmez (14). α -talasemiler Uzak Doğu, β -talasemiler ise Akdeniz ülkelerinde daha sıktır. δ ve γ zincirlerinin yapım bozukluğu sonucu görülen δ ve γ talasemiler genellikle klinik belirti vermezler (1,3).

2.1.1. β -Talasemiler

Talasemilerin klasik şeklidir. Bir pediatrist olan Dr.Thomas Cooley tarafından 1925 yılında 4 Yunan ve İtalyan çocukta hayatlarının ilk yıllarında derin anemi, hepatosplenomegali, büyüme geriliği ve kemik deformiteleri ile karakterize bir sendrom (Cooley Anemisi) olarak tanımlanmıştır (1, 14-17). Daha sonra benzer vakaların görülmesi üzerine bu herediter hemolitik anemiye Van Jaksch anemisi, splenik anemi, eritroblastozis adları verilmiştir (6). 1936'da George Whipple ve Lesley Bradford inceledikleri vakaların Akdeniz civarı ülkelerden geldiğini saptadıkları hastalığa deniz anlamına gelen "thalassa= Deniz (eski Yunanca)" adını vermişlerdir (14,18). Zamanla bu hastalığın yalnız Akdeniz ülkeleri toplumlarında olmadığı diğer toplumlarda

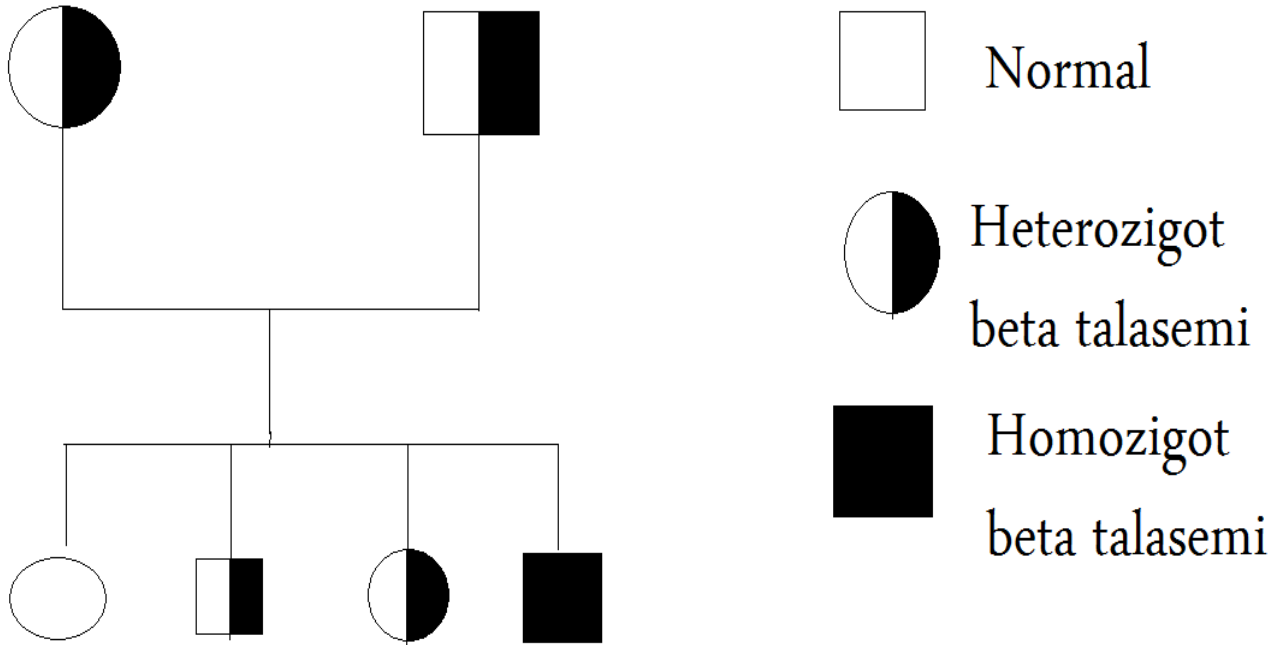
da bulunduğu saptanmıştır (19). Türkiye’de ilk iki talasemi vakası Ord. Prof. Dr. Sedat Tavat ve Prof. Erich Frank tarafından 1940 yılında eşzamanlı olarak bildirildi (18). Valentine ve Neel talasemi genetiğini aydınlatarak talasemi minor ve major terimlerini 1944 yılında tıp literatürüne eklediler (18).

Talasemi yaygın görülen tek gen hastalıklarından olup, α globin zincirini sentezleyen gen 16. kromozomda ve β globin zincirini kodlayan gen 11. kromozomda yer almaktadır. α -talasemide moleküler defekt daha çok delesyon, β -talasemide ise nokta mutasyonlar şeklindedir (1,2,5,6). Ülkemizde talasemi mutasyonları çok heterojendir. Toplam 35’in üzerinde mutasyon olduğu bilinmektedir. Mutasyonların dağılımı büyük farklılıklar göstermez (6,20).

β -talasemi, otozomal resessif geçiş özelliği olan bir hastalıktır. Temel kalıtsal özellikleri şöyle özetlenebilir:

1. Eşlerden birisinin taşıyıcı olması halinde çocukları en fazla kendileri gibi taşıyıcı olurlar.
2. Eşlerden her ikisinin de hastalığı taşımaları halinde; her gebelikte %25 olasılıkla hasta çocuk sahibi olma riskleri vardır (11) (Tablo 1).

Tablo 1. β -Talasemide kalıtım.



Görüldüğü gibi otozomal resesif kalıtılan hastalıklarda sağlıklı taşıyıcılık kavramı vardır.

Dünya popülasyonunun yaklaşık %3 kadarı (150 milyon) β -talasemi geni taşıyıcısıdır (4, 6,21). Bazı kaynaklara göre tüm dünyada 240 milyon kişi β -talasemi heterozigottur ve her yıl 200 bin β -talasemi hasta çocuk doğum olduğu sanılmaktadır (22). Özellikle Yunanistan ve İtalya'da bu oran çok yüksektir. En yüksek taşıyıcılık prevalansı Sardinya adasındadır (%11-34) (3,17). Türkiye genelinde β -talasemi taşıyıcılığı %2 olarak bildirilirken, geniş bölgesel farklar dikkati çekmektedir (%0.6-%10.8) (4). Ülkemizde 1.4 milyon taşıyıcı ve 4500 civarında talasemi hastası bulunmaktadır (5). Ülkemizde taşıyıcılık prevalansının bölgelere göre dağılımı incelendiğinde, Batı Trakya göçmenleri ve Güney Anadolu'da prevalansın daha yüksek olduğu görülmektedir. Talasemi taşıyıcılığı, İzmir'de %2.7, Antalya'da %5.7, Denizli'de %3.6, Adana'da %3.9, Batı-Trakya göçmenlerinde ise %10.8 olarak bildirilmektedir (4,5,21).

β -talasemiler klinik tablonun ağırlığına göre 3 ana grupta incelenir (1,3,4).

a) β -talasemi major (β -TM): β -talasemilerin en ağır formudur. Ağır anemi vardır. Düzenli kan transfüzyonu yaşam için gereklidir (1).

b) β -talasemi intermedia (β -TI): Zaman zaman semptomatik olan, infeksiyon, cerrahi vb. nedenler dışında genellikle transfüzyon gerektirmeyen orta şiddette anemisi olan hasta grubudur (1).

c) β -talasemi minör (β -talasemi taşıyıcılığı, talasemi trait): Genellikle asemptomatik olan hastalarda, eritrosit morfolojisinde değişiklikler vardır. Sıklıkla toplum veya aile taramaları ile tanı konulur. Anemi yoktur veya çok hafiftir.

2.1.1.1. β -Talasemi Major (Homozigot β talasemi)

Her iki β geni de talasemi mutasyonu taşıyor ise homozigot β -talasemi adı verilir. Moleküler defekt %5-30 civarında β globin zincir sentezine izin veriyor ise β^+ talasemi; β globin zincir sentezine izin vermiyorsa β^0 talasemi'den söz edilir. Ülkemizde en sık görülen IVS1-110 mutasyonu β^0 talasemi ve ikinci sıklıkla görülen IVS1-6 (T-C) mutasyonu ise β^+ talasemi nedenidir. Bu durumda kişinin taşıdığı moleküler defektin şiddeti, hastalığın klinik şiddetinin belirleyicisidir. β zincir sentezi ve kişinin heterozigot /homozigot oluşu klinik ağırlığı etkiler.

Homozigot talasemi olgularında hafif β -talasemi mutasyonu varlığı ve/veya β -talasemi yanısıra α - talaseminin veya fetal Hb üretimini arttıran γ globin geni modulatörlerinin kalıtılmış olması daha hafif klinik gidişe sahip “Talasemi İntermedia” fenotipine neden olmaktadır. Şiddetli moleküler defekte sahip olgular ise “Talasemi Major” olarak tanımlanan şiddetli hastalığa sahiptir (4,5).

2.1.1.1.1. Fizyopatoloji

β -talasemide, β globin zincir üretiminin azalması veya hiç yapılamaması buna karşın α zincir yapımının normal düzeyde devamı, α globin zincirinde relatif bir artmaya neden olur. α ve β globin subünitlerinin sentezindeki bu dengesizlik fizyopatolojideki temel olaydır. Artmış α globin subünitleri Hb tetrameri oluşturamazlar. α zincirlerinin, oksijen taşıma yeteneği olmadığı gibi, solubiliteleride azdır. Artmış, stabil olmayan serbest α zincirleri dimer şeklinde kemik iliğindeki eritroid öncü hücrelerin içinde birikir ve membranına çökerler. Eritrosit membranı çift katlı bir lipid zar ve onun altında onu destekleyen iskelet proteinlerinden yapılmıştır. Bu iskelet proteinleri spektrin, protein 4.1, protein 3, aktin ve glukoforinlerdir. β -talasemide biriken ve çöken α globin agregatları, protein 4.1'in bazı aminoasitlerinin oksidasyonuna neden olup, fonksiyonel ve yapısal anormalliğine yol açarlar. Neticede normalde spektrin, aktine bağlanmasını artıran protein 4.1, bu işlevini yapamaz. Spektrin-aktin-protein 4.1 ilişkisi bozulur (1,11). Çöken agregatlar, eritrosit membran ve organellerinde harabiyete ve eritrositin kemik iliği içinde yıkımına, eritroid prekürsörlerin ölümüne, ineffektif eritropoeze neden olmaktadır. Homozigot β -talasemide kemik iliği normoblastlarının %15-30'dan fazlası yıkımdan kurtulamamaktadır. Alfa zincirlerinin yarattığı inklüzyonlar (Hemikromlar) eritroid kök hücrelerin içinde bile görülmektedir (23,24). Eritroid hücrelerin kemik iliğinde yıkımı yüzünden dolaşımdaki hücrelerde ölçülen β/α globin sentez oranı, hastalığın ağırlık derecesi ile tam korelasyon göstermez. Çünkü globin dengesizliğinin çok fazla olduğu hücreler dolaşıma geçmeden yıkılmaktadırlar(11).

β talasemide; β globin zincir üretiminin eksikliği veya yokluğu, diğer zincirleri içeren Hb'lerin artışı (HbA₂ ve HbF artması) ile telafi edilmeye çalışılır. Fakat bu artışlar, β zincir yokluğunu yeteri kadar tamamlayamaz ve başlıca erişkin Hb'i olan HbA' nın eksikliği devam eder. Yine globinle bağlanmamış Hem ara ürünlerinin ALA sentetaz enzimi üzerine feed back inhibisyonu, Hb'nin eksik yapımına katkıda bulunur. Sonuçta fonksiyonel Hb tetramerlerinin

yapımında azalmaya bağlı olarak Hb seviyesi düşer ve hipokromi, mikrositoz, target hücreleri ve daha az sıklıkla gözyaşı hücreleri, mikrosferositler meydana gelir (1).

Olgunlaşmasını tamamlayarak periferik dolaşıma çıkabilen eritrositler hem yoğun olarak inklüzyon cisimleri taşıyor olmaları nedeniyle, hem de serbest “hem”, alfa zincirlerinin ve demir etkisiyle oluşan serbest oksijen (radikalleri) türevlerinin yaptığı patolojiler nedeniyle, dalakta ve retikuloendoteliyal sistem dokularında yıkıma uğramaktadırlar. Eşleşmemiş α zincirleri direkt yoldan veya oluşturduğu oksidatif hasar nedeniyle eritrosit membranının antijenik yapısında değişikliğe yol açar. Bu antijenik yapı değişikliği otoreaktif IgG antikorları oluşumuna neden olmaktadır. IgG antikorları α -antigalaktosit ile reaksiyona girer, membran içeriğindeki sialik asitte azalmayla, talasemik eritrositlerin dolaşımdan temizlenmesine yardımcı olabilir (1). Demir normalde membranda bulunmaz. Ama talasemide denature Hb ve membran kompleksi “hemichrome” oluştururlar (11). Bu hücrelerin dalaktan geçişleri sırasında değişik şekilli eritrositler ortaya çıkar (poikilositoz). Anormal eritrositlerin yıkım yeri olan dalak, konjesyona uğrar ve myeloid metaplazi ile beraber splenomegali gelişimi olur. Derin anemi ve oluşan doku hipoksisi eritropoetin üretimini artırarak kemik iliğinin normalin 15-30 kat genişlemesine, kortikal incelmeye ortaya çıkan tipik kemik deformitelerine ve mide-barsak lümeninden demir emiliminin artışına neden olur (6,19). Artmış demir emilimi ve kan transfüzyonlarıysa, aşırı demir birikimi ve bunun sonucu olan organ disfonksiyonlarından sorumludur (5). Fetal hayatta eritropoetik organlar olan dalak ve karaciğerde eritroid aktiviteye katılırlar (1,3,17).

Sonuç olarak β -talasemide globin zincir sentezindeki azalmaya bağlı olarak; azalmış Hb sentezi, artmış serbest globin zincirlerinin agregasyonu, ineffektif eritropoez ve ekstravasküler hemoliz talaseminin fizyopatolojisini oluşturur (1,13). Serbest alfa zinciri, klinik ve patolojik olaylarla direk bağlantılıdır.

2.1.1.1.2. Klinik

TM olgularında klinik bulgular kronik anemi, kemik iliğinde genişleme, demir birikimi ve kronik hemoliz ile ilişkilidir. Doğumdan 3-6 ay sonra, derin hipokrom ve mikrositer anemi ve kronik anemiye ait, solukluk, halsizlik, irritabilite, beslenememe, büyümede duraklama, yanısıra hepatosplenomegali ile ilişkili olarak karın şişliği ilk bulgulardır. Hb düzeyleri çoğunda ilk altı ay ile bir yıl arasında transfüzyon gerektirecek düzeylere iner. Uygun transfüzyon yapılmayan hastalarda, kemik iliğinin genişlemesi sonucu, tipik talasemik yüz görünümü (burun kökü basıklığı, maksilla ve alın kemiklerinin çıkıklığı) ortaya çıkar. Bu kemik değişiklikleri kafa, uzun

kemik ve parmaklarda karakteristik radyolojik bulgular ile birlikte. Vertebra ve uzun kemiklerde kemik iliği genişlemesine bağlı incelmeden dolayı kortekste spontan kırıklar olabilir. Maksiller kemikteki deformitelere bağlı olarak dental maloklüzyonlar ile ısırma ve çiğneme bozuklukları gelişir. İneffektif eritropoez, hipogonadizm, hipoparatroidi, hipotroidi, folat eksikliği, demir yükü, yoğun DFO tedavileri osteoporoza yol açan nedenler arasında sayılabilir. Demir aşırı yükü, gastrointestinal sistemden demir hiperabsorpsiyonu ve eritrosit transfüzyonları ile oluşur. Ciltte koyu renkli pigmentasyona ve yetersiz şelasyon alan olgularda, genellikle ilk on yıldan sonra, başta kardiyak fonksiyon bozukluğu olmak üzere, karaciğerde portal fibroz ve siroza, diyabet, hipotiroidi, hipoparatiroidi, büyüme ve gelişme geriliği gibi endokrin disfonksiyonlara neden olur. Epistaksis ve hemostatik diğer problemler KC fonksiyonlarındaki bozulmaya bağlı olarak gelişir ve daha çok koagülasyon faktörleri sentez bozukluğu sonucu oluşur. Renal tubuler dilatasyona bağlı böbreklerde büyüme, orta derecede proteinüri ve mikroskopik hematüri, interstisyel nefrit, demir depolanmasına bağlı olarak meydana gelmektedir. Büyük yaşlardaki hastalarda safra taşları, kolesistit ve diyare oluşabilir (4,6). Ölüm yaşamın 2. ve 3. dekatlarında konjestif kalp yetmezliği ve kardiyak aritmilerle beraber olup (1, 25), kalpte demir birikimi halen ölümlerin %70'inden sorumludur (26).

2.1.1.1.3. Laboratuvar

Anemi ilk bulgudur ve kan tranfüzyonu yapılmamış hastalarda hemoglobin konsantrasyonu 2.5-6.5 g/dl civarındadır. Anemi; hipokrom (MCHC:23-32 g/dl), mikrositer (MCV:48-72 fl) özelliktedir. Anizositoz çok belirgindir. Eritrosit çapları 3-15 µm gibi değişkenlik gösterir. Çoğunlukla şiddetli hemoliz sonucu, dolaşımdaki normoblastlar nedeniyle tam kan sayımında yalancı bir lökositöz vardır. Normoblast sayısı fazla olduğu halde, retikülosit yüzdesi beklenenden azdır. Retikülosit % 5-15 arası değişkenlik gösterir. Retikülositoza şiddetli hemolitik anemi ile ilişkili diğer biyokimyasal göstergeler (LDH artışı, indirek hiperbilirubinemi ve haptoglobulin azalması) eşlik eder. Serum demiri önemli oranda artmış, demir bağlama kapasitesi ise hafifçe artmıştır. Transferin saturasyonu %80'nin üzerindedir (1,5). Trombosit sayısı normal veya artmıştır. Periferik kan yaymasında, belirgin anizositoz, poikilositoz, polikromazi, hedef hücreler, göz yaşı damlası hücreler, normoblastlar, eliptositler ve parçalanmış anormal şekiller bulunur. Hipokromi çok belirgindir ancak mikrositoz kan yaymasında her zaman çok açık olmayabilir. Bazofilik noktalanma ve Pappenheimer cisimleri bulunur. Hastalığın genotipik şiddetine göre, Hb elektroforezinde HbA ya hiç yoktur ve yerini HbF'e (%98) ve Hb

A₂'ye (%2) bırakmıştır (β⁰ talasemilerde) ya da daha ılımlı genotipik özellik taşıyan olgularda olduğu gibi HbF (%70-80) ve HbA₂ (%2) yanısıra bir miktar HbA (%10-20) (β⁺ talasemi) bulunur. Talasemi intermedia olgularında HbF düzeyleri % 20-40 civarında olabilir. Kemik iliği hipersellülerdir ve eritroid hiperplazi (E/M:20/1) saptanır (1). Eritrosit prekürsörleri metil viole ile boyandığında α-zincir presipitat inklüzyonları görülebilir. β-TM'ün kesin laboratuvar tanısı rutinde yapılmayan, kemik iliği veya periferik kan retikülositlerinde globin biyosentetik oranına bakmaktır (1).

2.1.1.1.4. Tedavi

Klasik tedavi yaklaşımı eritrosit transfüzyonu, demir şelasyonu ve splenektomiden oluşur. Hematopoetik kök hücre transplantasyonu ileri tedavi yaklaşımlarındandır (27).

Eritrosit transfüzyonu: TM'lü hastaların yaşam süreleri ve kaliteleri 1960'larda uygulanan düzenli kan transfüzyonu ile artmıştır (28). Düzenli transfüzyon programı ile; aneminin düzeltilmesi, ineffektif eritropoezin baskılanması, gastrointestinal demir emiliminin inhibisyonu amaçlanır. Yine splenomegali, gelişme geriliği ve kemik deformasyonları gibi komplikasyonlar engellenir. Transfüzyon öncesi Hb'i 10g/dl (hipertransfüzyon) ve 12g/dl (süpertransfüzyon) tutacak şekilde transfüzyonlar amaca ulaştıran transfüzyon programları olmasına rağmen aşırı demir birikimi dezavantajıyla beraberdir (29-31). Transfüzyon öncesi Hb>9-9.5g/dl tutacak ılımlı transfüzyon rejimleri daha az demir birikimi ile beraber normalin 2-3 katı ilik baskılanması sağlar (29). Beta talasemi majorlü olgulara, transfüzyon öncesi Hb düzeyleri 9,5-11,5 g/dl olacak şekilde, 3-5 hafta aralıklarla, ABO-Rh(D) uygun lökositten fakir, log4 filtre ile eritrosit süspansiyonu 10-20 ml/kg dozda ve 2 saat içinde verilir (1). Transfüzyon öncesi periferik yaymada her 100 BK sayısına karşılık çekirdekli eritrosit sayısı 5'in altında, normal gelişme sağlanmış ve yıllık kemik grafileri takibinde kemik iliği alanı genişlememiş ise transfüzyon uygulaması başarılı kabul edilir (32).

Transfüzyon reaksiyonları, demir yüklenmesi ve transfüzyonla bulaşan enfeksiyonlar önemli transfüzyon komplikasyonlarından sayılabilir. Alloimmünizasyon hastaların %20-30'unda ve genelde 3 yaşın üzerinde transfüzyona başlayan olgularda, minor kan grup antijenlerine bağlı olarak gelişebilir. Bu yüzden hastaların ABO-Rh(D) dışında Rh subgrup (CcEe) ve Kell uygun kan almaları önerilir (1,33).

Transfüzyon programındaki hastaların 3 ayda bir boy, kilo, KC fonksiyon testleri, bilirubin, LDH, ferritin düzeyleri ölçülmelidir (1). Aynı zamanda hepatit A ve B virus aşılı ile aşılama

programına alınmalı; Hepatit (A, B, C) ve HIV serolojisi 6 ayda bir kontrol edilmelidir. Son yıllarda talasemik hastalarda transfüzyon sıklığını ve demir yükünü azaltmak amacıyla, neosit transfüzyonu, exchange transfüzyon, yapay kan gibi yenilikler üzerinde durulmaktadır (34-36).

Demir yüklenmesi uzamış transfüzyon tedavisinin istenmeyen ve ciddi bir komplikasyonudur. Çünkü her eritrosit süspansiyonunda 200-250 mg demir vardır. Vücudumuzda biriken demirin atılımını düzenleyen bir mekanizma yoktur (37). Transfüzyonlarla kazanılan demir önce kemik iliği ve RES makrofajları tarafından depolanır. Bu kapasite dolunca demir, makrofajlardan plazma transferrinine ve ardından parankim hücrelerine geçerek doku hasarını oluşturur (37). Demir şelasyon tedavisiyle, demir yükünün toksik etkisinin olmadığı güvenli doku demir seviyelerinde sürdürmek ve aşırı demiri detoksifiye ederek organizmayı demir toksisitesinden korumak amaçlanır (37). Demir şelasyonu, düzenli transfüzyon 1. yılını doldurduğunda ve/veya 10-12 transfüzyon sonrasında ve/veya serum ferritini 1000 µg/L düzeylerine ulaştığında ve/veya karaciğer demir yoğunluğu 3.2 mg/g'a ulaştığında başlatılır (29,37). Şelasyon tedavisi; serum ferritin düzeyi, R2 MRI ile KC demiri ve T2* MRI ile kardiyak demirin belirli aralıklarla ölçümü ile takib edilir. Fe⁺³ afinitesi yüksek, metabolizması yavaş, şelasyon etkinliği yüksek, doku penetrasyonu iyi, negatif demir dengesi sağlayan ve toksik olmayan şelatör, iyi bir demir şelatörüdür (37).

Desferrioksamin(DFO), demire karşı önemli affinitesi olan kompleks bir hidroksilamin'dir (1). Hücre içine girer, demiri bağlar, serum ve safrada demir bağlı ferriksamin formunda bulunarak atılır. 30-40 mg/kg dozda, desferrioksamin pompası ile 8-12 saatte subkutan infüzyon yoluyla genelde geceleri haftanın 5-7 günü, infüzyondan hemen önce 100 mg C vitamini ile beraber uygulanır (1, 2). Terapötik indeks <0.025 ve ferritin değerlerini 1000-1500 µg/L düzeyinde tutacak şekilde uygulanması gereklidir (37, 38). Parenteral uygulanması hasta uyumu açısından dezavantajdır. Retinopati, işitme kaybı, kemik/kartilaj displazisi ciddi yan etkilerindedir.

Deferipron (DFP), ülkemizde 2004 yılından itibaren "Standart tedavinin yetersiz kaldığı, tolere edilemediği veya kabul edilemez olduğu demir yükünün tedavisi" nde 75-100 mg/kg/gün 3 dozda kullanılabilen oral demir şelatörüdür (37). Günümüzde oral DFP'nun kalp dokusuna geçişinin daha iyi ve demir yükünün giderilmesinde daha etkili bir preparat olduğu kabul edilmektedir. Bu bulgu, ölümlerin çoğunun kardiyak komplikasyonlara bağlı olan talasemili hastalar için oldukça önemlidir. Solüsyon formu bulunmadığından 6 yaş altı çocuklarda deneyim

sınırlıdır. En sık yan etkisi bulantı ve kusmadır (39). En ciddi yan etkisi ise, genellikle tedavinin ilk aylarında ve splenektomili olmayan olgularda daha sık tanımlanan ve ilacın bırakılması ile gerileyen agranulositozdur (37,40). Bu yan etki 7-10 gün aralarla hemogram izlemine gerektirir (5).

Kombine Tedavi: Klinik çalışmalar DFO ve DFP'un sinerjik oldukları ve beraber kullanıldıklarında daha etkin sonuç alınabileceğini göstermiştir (41). Bu etki "shuttle" etkisi ile açıklanmaktadır: DFP lipofilik özelliği nedeniyle dokulara kolayca penetre olmakta demiri bağlayarak kan dolaşımında bulunan DFO'ye aktarmaktadır. DFP tek başına kullanıldığında plazmada bağlı demir geçici olarak artmakta, DFO eklenmesi ile DFP ile bağlı olan demir DFO aktarılarak daha etkin bir şelasyon yapılabilmektedir (42). Bu yüzden DFO'ya uyumsuz, DFP'nin tek başına etkin olmadığı, demir yükünün hızla azaltılması gereken (kök hücre transplantasyonu öncesi) hastalara özellikle önerilmelidir.

Deferasirox, 2005 yılında itibaren, suda eriyebilen formuyla 2 yaş ve üzeri transfüzyonel hemosideroz olgularında, 20-30 mg/kg/gün başlangıç dozunda ve günde bir kez alınan oral demir şelatörüdür. Kullanımı sırasında serum kreatinin düzeylerinin ayda bir kez izlemi, renal toksisite izlemi açısından uygundur. Deferasirox'un Fe⁺³ affinitesi yüksektir. 2 deferasirox molekülü bir demir atomunun 6 koordinasyon alanını bağlayabilir. Deferasirox, desferrioksamine göre lipofilik, daha küçük molekül ağırlığına sahip olup, kalp hücrelerinden demiri daha iyi uzaklaştırdığı gösterilmiştir (37,43).

Splenektomi: Splenektomi ağır β-talasemili hastaların tedavisinde sıklıkla kullanılır (1,2,17). Masif splenomegalili, lökopeni ve trombositopenisi olan, minimum Hb:9-9.5 gr/dl'yi sağlamak için yıllık kan tüketimi 200-250 ml/kg'ı aşan 5 yaşın üzerindeki olgularda splenektomi önerilir (1,29,44). Talasemi intermedia olgularındaysa dalak boyutlarının >7 cm olması ve/veya Hb seviyelerinde düşüş splenektomi endikasyonudur. Splenektomiden 4-6 hafta önce N.meningitidis, S.pneumoniae ve H.influenzae aşuları yapılmalı ve splenektomi sonrası en az 2 yıl ve >16 yaşa kadar penisilin profilaksisi başlatılmalıdır (5).

Hematopoetik kök hücre transplantasyonu: TM olgularına hastalıksız yaşam sunan tek sağaltım şeklidir. Talasemi majorlu hastalarda ilk kemik iliği nakli 1981 yılında Thomas ve ark.ları tarafından gerçekleştirilmiştir (5). HLA tam uygun kardeş veya tam uygun aile içi vericisi olan her talasemili hastaya en erken dönemde hematopoetik kök hücre transplantasyonu uygulanmalıdır. Hepatomegali (kosta kenarında 2 cm 'den daha fazla), karaciğer fibrozisi ve aşırı

demir yükü bulunmaması (Pesaro kriterleri) transplant başarısının belirleyicisidir. Toksikiteden erken ölüm ve graft versus host hastalığı oranı gençlerde hepatik disfonksiyon yoksa düşüktür (%10'dan az). Yine transplant sonrası mikst kimerizm olasılığı ve demir yükü açısından olgular takip edilmelidir. Bugün için hastalığın tek kesin tedavi yöntemi allogenik kök hücre transplantasyonu olmasına rağmen, gelecekte genetik mühendislik ile yapılabilecek gen tedavileri sayesinde hastalık için kesin kür sağlanabilecektir (45).

2.1.1.1.5. Prognoz

Hastanın uygun transfüzyon ve düzenli şelasyon tedavisi alıp almaması ile yakından ilişkilidir. Uygun transfüzyon ve şelasyon tedavisi almayan hastalar çok erken yaşlarda anemi, kalp yetmezliği veya KC yetmezliğinden kaybedilir. 1960-1976 yılları arasında sadece konvansiyonel transfüzyon ile hastalarda ortalama yaşam 17 yıl, hipertransfüzyon ve düzgün şelasyon tedavisi ile 31 yıl olarak saptanmıştır (17). Talasemi majorlü hastalarda en sık ölüm nedeni kalp yetmezliğidir. Kan transfüzyonları ile Hb düzeyi normal düzeylerde tutularak kalpteki büyüme azaltılabilir. Fakat tekrarlayan transfüzyonlara bağlı olarak hayatın ikinci on yılında kardiyak hemosiderozis sonucu kardiyak problemler ön safhaya geçmekte, aritmi ve dirençli kalp yetmezliğinden dolayı hastalar kaybedilebilmektedirler (3,17).

2.1.1.1.6. Talasemi kontrol programı (Taşıyıcıların saptanması ve prenatal tanı)

Homozigot talasemi olgularının ağır morbidite ve erken mortalite özelliği, sağaltım maliyetlerinin yüksekliği, buna karşın taşıyıcıların ise basit hematolojik testlerle saptanabilir oluşu, bu genetik hastalığın toplum temelinde eradikasyonuna olanak sağlamaktadır. Bu 2 temel yaklaşımla gerçekleştirilir (5).

a) Evlenecek olan çiftlerin, talasemi taşıyıcılığı açısından taramaları ve her ikisinin de taşıyıcı olduğu (risk altındaki) çiftlerin belirlenmesi. Bu tarama çalışması, MCV<80 fl ve OEHB < 27 pg olan olguların Hb elektroforezi ile HbA₂, HbF ve anormal Hb'ler için değerlendirilmesi şeklinde gerçekleştirilir (5).

b) Risk altındaki çiftlere, genetik danışma verilmesi ve çocuk sahibi olmak istediklerinde prenatal tanı önerilmesi. Talasemilerde başarılı ilk prenatal tanı 1975 yılında Kan ve ark.ları tarafından fetal kanda globin sentez oranlarının gösterilmesi ile gerçekleştirilmiştir (46). Risk altındaki çiftlerde, hasta çocuk sahibi olma olasılığı, her gebelikte %25'tir. Risk altındaki çiftler bebek sahibi olmak istediklerinde önce moleküler genetik (DNA) analizi yapılır ve taşıdıkları

mutasyon saptanır. Talasemilerde prenatal tanı amacıyla gebeliğin 18-20. haftalarında fiberoptik fetoskoplar kullanılarak fetal umbilikal venden alınan kan örneklerinde α , β , γ -globin biyosentez oranları incelenmektedir (3). Gebeliğin 15-17. (16-18) haftalarında amniyositlerden, 9-11. (8-12) haftalarında koryonik villus biyopsisi ile alınan örneklerden fetal DNA çalışmaları yapılmaktadır (1,3). Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) kullanılarak yapılan fetal DNA çalışmasıyla 1-3. günde spesifik tanı konulmaktadır. PCR yöntemi ile maternal kanda fetal kökenli çekirdekli eritrositlerde de genetik markerler aranabilir (3). Yine DNA analizi yöntemi ile fetusun anne ve babanın mutasyonlarını taşıyıp/taşımadığı yani hasta olup/olmadığı saptanır. Fetusun hasta olduğunun saptanması durumunda aileye tıbbi abortus önerilir. Fetus tamamen normal (%25) veya sadece taşıyıcı (%50) ise doğum beklenir.

2.1.1.2. β -Talasemi intermedia

Homozigot β -talasemilerin yaklaşık %10 kadarında klinik seyir β -TM'den daha hafif ve talasemi taşıyıcılarından daha ağırdır. β -talasemi intermedia (TI) adı verilen bu grupta periferik kan bulguları ve eritrosit indeksleri β -TM' de olduğu gibidir (4). Hb elektroforezinde HbA, HbF ve HbA₂ seviyeleri değişkenlik göstermektedir. Genellikle 2 yaşından sonra tanı alırlar, klinik olarak aneminin şiddeti daha ılımlıdır (Hb:7-7,5/dl ve üzerinde). Klinik, hematolojik ve moleküler çalışmalar ile TM/TI ayırıcı tanısı başlangıçta yapılmalı gereksiz transfüzyon ve komplikasyonlarından böylelikle korunulmalıdır. β -TI'lı olgular genelde düzenli transfüzyon gereksinimi olmaksızın normal büyüme ve gelişmelerini sürdürebilirler (6). Bazı β -TI'lı olgular ise kardiyomegali, osteoporoz, kırık, artrit, splenomegali ve hipersplenizm gibi komplikasyonlara maruz kalabilmektedir. Yaşamın ikinci 10 yılında safra taşları, geç adölesan ve daha sonraki dönemlerde transfüzyon almayan hastalarda bacak ülserleri gözlenebilmektedir. Aneminin derecesi hipersplenizm, enfeksiyon varlığı veya folat eksikliği gibi nedenlerle ağırlaşmakta ve çok değişkenlik göstermektedir. Parvovirus B19 veya diğer enfeksiyonlara bağlı aplastik krizler olabilmekte ve buna bağlı olarak da hayatı tehdit eden anemi görülebilmektedir. Daha hafif klinik gidişe karşın, bu olgularda da hepatosplenomegali, kemik değişiklikleri, intestinal demir emiliminin yüksek oluşu nedeniyle aşırı demir yükü ve ilişkili organ disfonksiyonları oluşabilir. Sekonder hipersplenizm gözlenen hastalarda splenektomi sonrasında anemilerin derecesinde düzelme olup kan transfüzyon gereksinimleri ortadan kalkabilmektedir. Bu komplikasyonlar

TM'deki gibi Hb seviyesini normal düzeylerde idame ettirip endojen eritropoezi süprese edecek şekilde transfüzyon programları ile önlenebilmektedir (4-6).

2.1.1.3. β -Talasemi Minör (β -talasemi taşıyıcılığı, talasemi trait)

İki β globin geninin sadece birinin defektif olduğu bireyler β -talasemi taşıyıcısı olarak tanımlanan heterozigot β^0 veya β^+ talasemi olgularıdır. Talasemi taşıyıcıları tamamen sağlıklı bireyler iken hemogramlarında hipokromi, mikrositoz, anizositoz, poikilositoz, target hücreleri ve bazofilik noktalanma olabilir. Bu özellikleri nedeniyle toplumdaki en sık hipokrom mikrositer anemi nedeni olan demir eksikliği ile ayırıcı tanıya gereksinim göstermektedirler (Tablo 2) (5).

Tablo 2. β -talasemi taşıyıcılığı ve demir eksikliği anemisi ayırıcı tanısı (5).

Anemi	Eritrosit	Hb	MCV	OEHb	RDW	MI
Demir Eksikliği	N / ↓	↓ / ↓↓	↓	↓	>14	>13
β-Talasemi taşıyıcı	↑	N / ↓	↓↓	↓↓	<14	<13

MI: MCV / Eritrosit sayısı

Aynı zamanda, demir eksikliği anemisinde serum ferritin veya transferrin saturasyonu, β -talasemi taşıyıcılığında ise Hb elektroforezi (özellikle HbA₂ düzeyi ölçümü) ayırıcı tanıda önemlidir (5). β -talasemi taşıyıcılığında, yaşamın 6. ayından sonra Hb elektroforezi ile ölçülen HbA'nın %90-95'lere indiği, HbA₂ düzeyinin (>% 3.5-4) olduğu görülür (2,5). Bu olguların yaklaşık %50'sinde HbF değerleri normal veya hafifçe yüksektir (HbF %1-5). $\delta\beta$ talasemi ve herediter persistan fetal hemoglobin taşıyıcılarında ise, HbA₂ düzeyleri normal iken HbF düzeyleri sırasıyla %2-10 ve %10-40 arasında değişmektedir (2).

2.1.2. α -Talasemiler

Alfa globin zinciri yapımı sorumluluğu 16 nolu kromozom üzerindeki gen kümesindedir. Alfa talasemi, alfa globin genlerinin delesyonu sonucu ortaya çıkar ve normal olarak her kişide iki 16 kromozom ve 4 alfa geni olduğu düşünülür ise delesyon bu genlerin birinde, ikisinde, üçünde veya dördünde oluşabilir (4,13). β -talasemiden farklı olarak intraüterin dönemde de mevcut olup, çoğunluğu hafif şekildedir ve erişkin heterozigotlarda bulgu yoktur (14).

Hastalığın ağırlığı etkilenen alfa geni sayısı ile doğru orantılıdır.

a) Sessiz (hafif) alfa talasemi taşıyıcılığı (alfa talasemi-2): Dört alfa geninden birinde parsiyel veya tama yakın delesyon veya fonksiyonel bozukluk vardır ($-\alpha/\alpha\alpha$). Bu hastalar genellikle klinik veya hematolojik olarak tamamen normal olup semptomları olmaz. HbH'li hastaların aile incelemesi sırasında tespit edilirler. Yenidoğan devresinde kordon kanında % 2-5 oranında Hb Barts tespit edilir. Bu da ilk üç aydan sonra kaybolur. Yenidoğan devresi dışında bunların tesbiti ancak in-vitro Hb zincir sentezi ve DNA çalışmaları ile olur (4). Bu genin anti-örak hücre geni olduğu düşünülmektedir. Çünkü gizli alfa talasemi taşıyıcısı olan homozigot örak hücre anemilerde hastalık hafif seyretmektedir (14).

b) Ağır alfa talasemi taşıyıcılığı veya alfa talasemi-1: Aynı kromozom üzerinde iki veya farklı kromozom üzerinde birer alfa geninde parsiyel veya tama yakın delesyon veya fonksiyonel bozukluk vardır ($-\alpha/-\alpha$; $--/\alpha\alpha$). Beta talasemi taşıyıcılarında görülen hematolojik bulgulara benzer bulgular gözlenir. Bu hastalarda anemi yoktur ama periferik kan yaymasında eritrositlerde hipokromi, mikrositoz, anizositoz, poikilositoz, polikromazi ve bazofilik noktalanma vardır. HbA₂ ve HbF düzeyleri normaldir. MCV düşüktür. Yenidoğan devresinde %5- 10 Hb Barts vardır, fakat altı aydan sonra görülmez. Bu durumun hastalar açısından en önemli sıkıntısı teşhis amacıyla uygulanan bir çok test ve zaman kaybıdır. İn vitro Hb zincir sentezi ve DNA çalışmaları ile kesin tanı konur. İki alfa talasemi-1 taşıyıcı ($--/\alpha\alpha$) bireyin evlenmesi %25 oranında letal homozigot hastalık oluşturabilir (4,14).

c) HbH hastalığı: ($--/-\alpha$). Dört alfa geninden üçünde parsiyel veya tam fonksiyonel bozukluk vardır. HbH hastalığında klinik bulgular TI'ya benzer. Hastaların hafif splenomegalileri, sarılıkları vardır. Periferik kan yaymalarında eritrositlerde hipokromi, mikrositoz, anizositoz, poikilositoz, polikromazi ve target hücreleri vardır. Supravital boyalarla eritrosit içinde β globin zincirlerinin oluşturduğu inklüzyonlar görülür. Yenidoğan devresinde Hb elektroforezinde % 20-40 oranında Hb Barts gözlenir. Daha sonra bunun yerini % 5-30 oranında HbH alır. İn vitro Hb zincir sentezinde alfa zincir sentezinde azalma görülmesiyle ve DNA çalışmaları ile kesin tanı konur (4). Tedavide aralıklı transfüzyon ve folik asit desteği yapılır.

d) Hidrops fetalis: ($--/--$) α -talaseminin en ağır formudur. Dört alfa geninin dördünde de tam veya kısmi delesyon veya fonksiyon kaybı ile Hb Barts'a bağlı hidrops fetalis oluşturur. Hb Barts'ın oksijene olan affinitesinin çok yüksek olması nedeniyle dokulara oksijen geçişi olmaz, fetuslar genellikle hipoksiye bağlı ölü doğarlar (4).

2.2. Oksidatif Stres ve Total Antioksidan Kapasite

Atomlarda elektronlar orbital adı verilen uzaysal bölgede belirli enerji düzeylerinde, birbirine zıt momentli çiftler halinde bulunurlar (8). Serbest radikaller; radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron çıkması veya ilavesi sonucu elektron çiftinin dengesinin bozulmasıyla oluşan, dış yörüngesinde eşleşmemiş elektron taşıyan, organik ve inorganik moleküller ile reaksiyona girebilme yeteneğine sahip, yüksek oranda reaktif kısa ömürlü bileşiklerdir (47). Normal metabolizma sırasında ya da patolojik intra ve ekstrasellüler olaylarla ortaya çıkan serbest radikallerin etkileri oksidatif stres olarak adlandırılır. Bu radikaller ortamdan uzaklaştırılmadığı takdirde, enzim ve proteinleri inaktive ederek (kovalent bağlanma teorisi) veya serbest radikalın kendisi primer olarak (serbest radikal teorisi) hücre hasarına veya ölümüne neden olabilirler (47). Sonuçta serbest radikaller erken yaşlanma, kanser, otoimmün hastalıklar, enflamatuar hastalıklar gibi birçok hastalıkların etyopatogenezinde suçlanmaktadır (48-50).

2.2.1. Serbest Oksijen Radikalleri

Oksijenden zengin atmosferde yaşarız ve oksijen birçok metabolik aktivite için gereklidir. Aerobik canlıların enerji metabolizmasındaki rolü nedeniyle hayati öneme sahip oksijen, yer aldığı biyokimyasal tepkimelerde gerçekleşen enzim inhibisyonları ve oluşan oksijen radikalleriyle toksik etki de yapabilmektedir (8, 50-52). Oksijen radikalleri, biyolojik sistemlerde meydana gelen serbest radikallerin en önemlisidir. Serbest oksijen radikalleri, normal hücre metabolizmasında oksijen içeren birçok biyokimyasal indirgenme reaksiyonları (mitokondrilerdeki oksijenli solunum gibi) sonucunda oluşabilmektedir (50- 53) (Tablo 3).

Tablo 3 : Reaktif oksijen partiküllerinin kaynakları (8,54).

I - Normal biyolojik işlemler

- 1 - Oksijenli solunum
- 2 - Katabolik ve anabolik işlemler

II - Oksidatif stres yapıcı durumlar

- 1 - İskemi - hemoraji - travma - radyoaktivite - intoksikasyon
- 2 - Ksenobiotik maddelerin etkisi

- a-) İnhale edilenler
- b-) Alışkanlık yapan maddeler
- c-) İlaçlar

- 3 - Oksidan enzimler

- a-) Ksantin oksidaz
- b-) İndolamin dioksigenaz
- c-) Triptofan dioksigenaz
- d-) Galaktoz oksidaz
- e-) Siklooksigenaz
- f-) Lipooksigenaz
- g-) Monoamino oksidaz

- 4 - Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu

5 -Fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma (nötrofil, monosit, makrofaj, eosinofil, endotelial hücreler)

- 6 - Uzun süreli metabolik hastalıklar

7 - Diğer nedenler: Sıcak şoku, güneş ışını, sigara

III - Yaşlanma süreci

Vücutta üretilen radikaller her zaman zararlı olarak görülmemelidir. Oksijenin biyokimyasal tepkimelerde kullanılması için reaktif formlarına çevrilmesi zorunludur. Örneğin, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, steroid yapıdaki çok sayıdaki bileşiklerin ve eikozanoidler

gibi biyolojik aktif moleküllerin sentezi, çok sayıdaki oksidaz ve hidroksilaz enzimleri ve sitotoksik etkilere sahip hücrelerin fonksiyonları için radikal yapımı elzem bir koşuldur (53).

En Önemli Serbest Oksijen Radikalleri; O_2^- (Süperoksit) Radikali, H_2O_2 (Hidrojen Peroksit), HO^- (Hidroksil Radikali) ve Singlet Oksijen'dir ($O_2^{\uparrow\downarrow}$). Bunların dışında; $HOCl$ (Hipoklorid), ROO^- (Peroksil radikali), $RCOO^-$ (Organik peroksit radikali), HO_2^- (Perhidroksil radikali), RO^- (Alkoksil radikali) gibi reaktif oksijen türevleri sayılabilir.

2.2.1.1.Süperoksit Radikali

Moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesiyle kararsız bir yapı olan O_2^- radikali oluşur ($O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$). H_2O_2 kaynağı olup canlılarda olduğu ilk gösterilen serbest radikal türevidir. Hücre dışı ortamda endotel hücreleri, lenfositler, trombositler, fibroblastlar ve diğer hücreler tarafından normal hücrel reaksiyonlar sonrası ortaya çıkan zayıf bir oksidan olan O_2^- 'nin kendi başına önemli hücre hasarlarına yol açması mümkün görülmemektedir (8). Ancak süperoksit radikalleri oksitleyici ve metal iyonları redükleyici etkisi ile oksidatif strese yol açabilen bir dizi reaksiyonları başlatabilir. Aktive edilen fagositik lökositlerden bol miktarda süperoksit üretilerek, fagozom içine ve buldukları ortama verilebilir. Antibakteriyel etki için gerekli olan bu radikal yapımı, daha reaktif türlerin oluşumunu da başlatabilmektedir [50, 51, 53, 55).

2.2.1.2.Hidrojen Peroksit

O_2^- 'e bir elektron eklenirse (süperoksit dismutasyonu) veya oksijenin direkt olarak indirgenmesiyle hidrojen peroksit oluşur. Dismutasyon spontan olarak veya Süperoksit Dismutaz (SOD) enzimi aracılığıyla katalizle olabilir ($2 O_2^- + 2 H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$). Metal iyonlarının varlığında hidroksil radikallerinin oluşumuna neden olmasından dolayı radikal olmamakla birlikte reaktif oksijen kategorisine sokulur (47,56).

Zar fosfolipidleri nedeniyle hücre zarı yüzeyleri sitoplazmaya göre daha asidiktir ve süperoksit burada daha kolayca bir proton alarak hidrojen peroksit radikali oluşturabilmektedir. Hidrojen peroksit membranlardan kolaylıkla geçip hücreler üzerinde bazı fizyolojik rollere sahip olabilir. Hidrojen peroksit özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek, yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturmaktadır. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilmektedir (47,51,53).

Nötrofiller tarafından kullanılan antibakteriyal savunma mekanizması myeloperoksidaz enzimidir. Hidrojen peroksit myeloperoksidaz enzimi aracılığıyla reaksiyona girerek güçlü bir antibakteriyal ajan olan hipoklorik asidi oluşturur. İnfeksiyöz ajanlarla savaş için gerekli olan radikaller kan hücreleri tarafından aşırı salgılanacak olurlarsa bu kez yarar yerine zararlı olmaya başlarlar (8).

2.2.1.3. Hidroksil Radikali

En tehlikeli reaktif oksijen radikalidir. Normal biyolojik fonksiyonlarda da kullanılmaktadır. Fagositoz ve çeşitli enzimatik katalizlerde üretilmektedir (51,53,57). Ana oluşum yolları;

- a) Fenton reaksiyonu: Hidrojen peroksit Fe^{+2} ve diğer geçiş elementleri (Cu, Zn, Mn, Cr, Co, Ni, Mo) varlığında indirgenerek $HO\cdot$ radikali oluşur ($Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + HO\cdot + OH^-$).
- b) Haber-Weiss reaksiyonu: Hidrojen peroksit O_2^- ile reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturur (reaksiyon bakır ve demir tarafından katalizlenir) ($O_2^- + H_2O_2 + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O + HO\cdot$).
- c) Dokular gamma radyasyona maruz kaldıklarında, enerjinin çoğu hücre içindeki su tarafından absorbe edilmekte ve radyasyon, oksijen ile hidrojen arasında kovalent bağa neden olmaktadır ($H_2O \xrightarrow{X \text{ veya } \gamma \text{ ışını}} H\cdot + HO\cdot$).
- d) H_2O_2 'nin UV ışığına maruz kalması ile de hidroksil radikali oluşabilmektedir ($H_2O_2 \rightarrow 2 HO\cdot$) (53).

Hidroksil radikali biyolojik makromolekülerin bütün türlerine atak yaparak, DNA'nın pürin ve pirimidin bazları ile etkileşebilmekte, DNA sarmalında kırılmalara, enzim inaktivasyonuna neden olabilmektedir (47, 58). Lipid peroksidasyonu, hidroksil radikali ile oluşan en iyi tanımlanmış biyolojik hasardır (51,53).

2.2.1.4. Singlet Oksijen

Oksijenin uyarılmış şekli "singlet oksijen" olarak adlandırılır. Normal oksijenden çok daha hızlı bir biyolojik moleküldür. Reaktivitesi çok yüksek bir oksijen türüdür. Singlet O_2 , oksijen elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün tersi yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi neticesi oluşabileceği gibi süperoksit radikalinin dismutasyonu ve hidrojen peroksitin hipoklorit ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir.

Doymamış yağ asitleri ile doğrudan tepkimeye girerek peroksil radikalini oluşturmakta ve hidroksil radikali kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu oluşturabilmektedir (53).

2.2.2. Serbest Oksijen Radikallerinin Hücrelere Olan Zararlı Etkileri

Serbest radikaller; hücre organelleri ve membranındaki lipid ve protein yapısını bozarlar. Hücre içi yararlı enzimleri etkisizleştirirler. DNA'yı tahrip ederler. Mitokondrilerdeki aerobik solunumu bozarlar. Elastaz, proteaz, fosfolipaz, lipoksigenaz, siklooksigenaz, ksantinoksidaz, indolamin dioksigenaz, triptofan dioksigenaz, galaktoz oksidaz gibi litik enzimleri aktive ederler. Hücrenin potasyum kaybını arttırırlar. Trombosit agregasyonunu arttırırlar. Dokulara fagosit toplanmasını kolaylaştırırlar. Hücre dışındaki kollagen doku komponentlerini, savunma enzimlerini ve transmitterleri yıkarlar (8).

2.2.2.1. Membranların Lipid Peroksidasyonu

Serbest oksijen radikallerin en önemli etkileri lipidler üzerine olup, lipidlerin oksidatif modifikasyonunu katalizlerler. Biyomembranlar, mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi hücre içi organellerin membran fosfolipidlerindeki poliansatüre yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyona uğrayabilmekte, dolayısı ile hücre ve organel zarlarında oksidatif hasarlara neden olabilmektedir (47).

Lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin doymamış yağ asitlerinin metilen grubundan bir hidrojen atomunu çıkarmak için yaptıkları atakla başlamakta ve zincir reaksiyonu şeklinde ilerlemektedir. Oluşan lipid radikali oksijen ile reaksiyona girer ve lipid peroksi radikalini oluşturur. Peroksiradikal, elektronları ve diğer duyarlı yağ asitlerini alarak lipid radikal ve lipid hidroperoksitleri oluşturur. Lipit peroksitleri hücre zarlarının önemli bir komponentidir ve Fe, Cu gibi geçiş metallerinin varlığında alkoksi ve peroksi radikallerini verirler. Bu nedenle Fe veya Cu tuzları lipit peroksidasyonunu hızlandırır (8). Sonuçta hücre zarının akıskanlığını ve permabilitesini azaltarak geri dönüşümsüz olarak zar bütünlüğünün bozulmasına yol açarlar. Permeabilite özelliklerinin değişmesi anormal Ca^{+2} girişine yol açarak hücre fonksiyonlarının bozulmasına ve oksidasyonla fosforilasyonun ayrılmasına yol açabilmektedir. Lizozomal membranların tahribi hidrolitik enzimlerin salınmasına ve intrasellüler sindirime neden olur. Biriken hidroperoksitler direkt olarak toksik etki göstermenin yanısıra duyarlı aminoasit

kalıntılarını okside eder veya polimeraz zincir reaksiyonlarıyla enzimleri inaktive edebilirler (59-62).

Peroksiradikali, poliansatüre yağ asidi moleküllerini okside edebilmekte, radikallerin ve aldehidlerin oluşmasına neden olan hidroperoksitlerin meydana gelmesini sağlayabilmektedir. Bu maddelerin yıkılması sırasında oluşan aldehidler uzun ömürlü olduklarından hücre hasarının yayılmasına neden olabilmektedirler. Aldehidler arasında en iyi bilinen sitotoksik ürün üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşan malondialdehitdir (MDA) (53). MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir, ancak lipid peroksidasyonunun derecesi ile korelasyon gösteren son üründür. Peroksidasyonla oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanmasına ve polimerizasyonuna sebep olmaktadır. Bunun sonucunda da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özellikleri değişmektedir (53, 63].

2.2.2.2. Proteinlerin Oksidatif Modifikasyonu:

Proteinler, serbest radikal hasarına duyarlı moleküllerdir. Proteinlerin, sülfhidril veya amino gruplarıyla serbest radikallerin etkilemesi sonucu protein moleküllerinin yapısı değişmekte amino asitlerin modifikasyonu, proteinlerin fragmentasyonu, agregasyonu veya çapraz bağlanmaları gibi hasarlar meydana gelebilmektedir (59, 64). Proteinin temel yapısındaki değişme, antijenitesindeki değişmeye ve proteolize hassasiyete yol açabilir. Radikaller, membran proteinleri ile reaksiyona girebilirler. Enzim, nörotransmitter ve reseptör proteinlerinin fonksiyonlarının bozulmasına neden olabilirler (59, 65). Hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin O_2 veya H_2O_2 ile reaksiyonu methemoglobin oluşumuna sebep olur (53, 59, 63).

2.2.2.3. Karbonhidratlara Etkileri:

Monosakkaritlerin otooksidasyonu ile vücudumuzda H_2O_2 , peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelmektedir (53). Serbest radikallerin gözün vitröz sıvısında bol miktarda bulunan hyalüronik aside oksidatif hasarı katarakta zemin hazırlarken; eklem sinovial sıvısına geçen nötrofillerden extrasellüler sıvıya salınan H_2O_2 ve O_2 , bu bölgedeki hyalüronik asidi parçalayarak enflamatuvar eklem hastalıkları oluşumuna katkıda bulunmaktadır (53, 66).

2.2.2.4. Oksidatif Stres ve DNA Lezyonları:

Proteinler, lipidler ve karbonhidratlar gibi DNA'da kimyasal-oksidatif hasara uğrayabilmektedir. İnsan vücudunun her hücresinde DNA'nın günde 10^3 kez oksidatif hasara maruz kaldığı öne sürülmüştür (50). DNA hasarı ve onarımı arasındaki denge nedeniyle, çok düşük düzeylerde hasar sağlıklı bireylerde de saptanmaktadır. Antioksidan enzim düzeylerindeki azalma, DNA onarım mekanizmalarında defekt olması oksidatif DNA hasarının artmasına yol açmaktadır. DNA'da tek ve çift dal kırıkları, kontrolsüz baz dizilimi, baz modifikasyonları, DNA-protein arasında çapraz bağlanma oksidatif hasarlarla olabilir (50,67,68). Bu oksidatif DNA hasarları mutasyonlara, kanserogeneze ve yaşlanmaya yol açabilir (69).

Serbest radikaller, DNA'da mutasyonlara ve hücre ölümlerine yol açabilirler. DNA'da oksidatif hasar oluşturan radikaller OH ve O_2^- radikalleridir. OH radikali, DNA'daki dört bazın herhangi birine saldırı yapabilirken, O_2^- dal kırığından ziyade, guanine spesifik bağlanarak hasar oluşturur (50,70).

DNA çok sayıda negatif yüklü fosfat grupları içeren ve çeşitli kationları bağlama yeteneğine sahip büyük bir anyondur. $Fe^{2+/3+}$ ve $Cu^{1+/2+}$ iyonları; negatif yüklü DNA'ya sürekli bağlı oldukları gibi oksidatif stres altında hücre içinde bulunan proteinlerden serbestleşerek de DNA'ya bağlanabilmektedirler. Metal iyonlarının bağlanmaları DNA molekülünü H_2O_2 'in hedefi haline getirmektedir (50,71). Doğrudan DNA'da hasar yapamayan H_2O_2 , membranı kolayca geçerek, nükleusta Fe-Cu iyonları ile reaksiyonlaşarak (Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları) reaktivitesi çok yüksek olan OH'lerini oluşturarak DNA'da hasara neden olur. Dolayısıyla OH'inin hücre içinde diffüz olarak nükleusa, DNA'ya geçme olasılıkları az olduğu halde reaksiyonlarla hasara neden olabilmektedir. Oluşan OH, radikal temizleyicileri tarafından uzaklaştırılmamaktadır. Yine OH temizleyicilerinin oluşturduğu radikaller de DNA'ya hasar verebilmektedir (50,72). Doku kültür ortamının Fe^{+3} ve Cu^{+2} iyon konsantrasyonunun artırılması ile oksidatif DNA baz hasarının arttığı ve H_2O_2 'e maruz bırakılan hücrelerde bakır ve/veya demir şelatörlerinin kullanımının DNA'daki oksidatif hasarı önlediği belirtilmiştir (73).

Yine oksidatif stres hücrede, sitozolik Ca^{+2} iyon konsantrasyonunda büyük bir artışa neden olarak nükleustaki Ca^{+2} bağımlı endonukleazları aktive etmekte ve DNA'nın fragmentasyonuna neden olmaktadır (nükleaz aktivasyonu hipotezi). Ca^{+2} şelatörlerinin kullanımı ile DNA hasarının engellenebildiğini gösteren araştırmalar bulunmaktadır (74).

DNA'da oksidatif hasar ile başlangıçta dal kırıkları oluşur. Tek dal kırıklarında, karşı daldaki bilgi doğru okunarak “*hasarlı dal onarıcı enzimlerle*” onarılabilir. Bu yüzden çift dal kırıkları daha önemlidir (68).

Organizmada normal şartlarda oluşan düşük düzeylerde oksidatif DNA hasarı, DNA onarım enzimleri sayesinde minimal hata riski ile etkin bir şekilde onarılabilir. Ancak DNA onarım enzimleri ve DNA polimeraz'ın oksidatif stres altında hasarlanmaları doğru replikasyon ve transkripsiyon olasılığını azaltmaktadır. Onarım tamamlanıncaya kadar, hücreler bölünmelerini genellikle durdurarak kendilerini korumaktadırlar (50,71). DNA'daki oksidatif hasar yüksek düzeylere ulaştığında hücre ölümü gerçekleşmektedir.

Son yıllarda yapılan araştırmalarda oksidatif DNA hasar göstergesi olarak sıklıkla baz hasarları analizlenmiştir. Bakır iyonları DNA'da Guanin-Sitozin'den zengin bölgelerde yüksek oranda bulunduğu için oksidatif hasara en fazla maruz kalan baz “Guanin” dir. Bu nedenle en yaygın olarak ölçülen baz hasarı 8-hidroksideoksiguanozin'dir. 8-hidroksideoksiguanozin, oksidatif DNA baz hasarının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (50, 67,68,75).

2.2.3. Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Savunma Mekanizmaları

2.2.3.1. Antioksidan Sistemler

Vücutta reaktif oksijen türlerinin düzeylerini kontrol altında tutmak ve oluşturabilecekleri hasarları engellemek için bir çok savunma mekanizmaları bulunmaktadır (76,77). Bu savunma mekanizmaları arasında oksidanların organizmadaki düzeylerini arttırıcı etkenlerin ve risk faktörlerinin iyi belirlenmesi ve bunlardan uzak durulması, radikallerle tetiklenen biyokimyasal reaksiyonları kırmak, oluşan mediyatörlerle aktive olan inflamatuvar hücrelerin lezyon yerine hücumunu ve orada aşırı birikimini önlemek sayılabilir. Oksidan moleküllerle mücadelede üzerinde durulacak esas girişim ise belirli düzeyi aşmış oksidanlara direkt olarak etki edip onları inaktif hale getiren antioksidanlardır (8). Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önlemek veya geciktirebilmek amacıyla serbest radikalleri metabolize eden, serbest radikal oluşumunu önleyen veya serbest radikallerin temizlenmesini arttıran bu maddelere “*antioksidanlar*” ve bu olaya antioksidan savunma denir. Bu antioksidanlar endojen ve eksojen kaynaklı olarak ikiye ayrılır (53, 54, 57, 76).

Endojen antioksidanlar, enzim olarak görev yapan ve enzim olmayan antioksidanlar olarak iki grupta incelenmektedir. Genel olarak enzimatik antioksidanlar hücre içinde, enzimatik olmayan antioksidanlar ise hücre dışında daha fazla etkilidir (GSH hariç).

Enzim olan antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT), glutatyon transferaz (GST), glutatyon redüktaz ve mitokondrial oksidaz sistemidir. Enzim olmayanlar ise, bilirubin, albumin, ürik asit, α -tokoferol, askorbik asit, seruloplazmin, transferrin, ferritin ve glutatyon gibi maddelerdir. Bunlar oksijen radikallerine karşı ilk savunma sistemini oluşturmaktadırlar (50,53,76). Eksojen antioksidan olarak da allopurinol, folik asit, B, C ve E vitamini, flavinoidler, asetilsistein, mannitol, adenzin, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antienflamatuar ilaçlar ve demir şelatörleri sayılabilir (50,53,76,78).

SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzimler, aktif oksijen türlerini direkt olarak etkileyen ilk savunma hattı olarak görev yaparlar. Bu savunma sistemleri yetersiz kalırsa ve lipid peroksidasyonu artarsa ikinci sıra savunma sistemleri devreye girer. Antioksidan bir enzim olan fosfolipid hidroperoksid, glutatyon peroksidaz, peroksidleri alkollerle indirgeyerek peroksidize edilmiş membran komponentlerini uzaklaştırma görevi yapar. Antioksidan olarak E ve C vitaminleri birlikte zincir reaksiyonlarını sonlandırarak peroksidlerin daha fazla birikmesini önlerler. Tüm bu savunma yetersiz kaldığında veya tükendiğinde hücre membranı o kadar çok hasara uğrar ki, sonunda hücre ölür.

Antioksidanlar etkilerini başlıca iki şekilde gösterirler:

1) Serbest radikal oluşumunun önlenmesi:

1. Başlatıcı reaktif türevleri uzaklaştırıcı etki,
2. Oksijeni uzaklaştırıcı veya konsantrasyonunu azaltıcı etki,
3. Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etki.

2) Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi:

a) Toplayıcı etki: Serbest oksijen radikallerini tutma ya da çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine “toplayıcı etki” denilmektedir. Bilirubin, antioksidan enzimler bu tip bir etki göstermektedirler (53,79).

b) Bastırıcı etki: Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip, onlara bir proton aktararak aktivitelerini azaltan ya da inaktif biçime dönüştüren etkidir (ör; Vit'ler, flavinoidler, bilirubin) (53).

c) Zincir kırıcı : Serbest oksijen radikallerine bağlanarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyerek serbest radikalleri uzaklaştırmaktadırlar (ör; Bilirubin, Hb, seruloplazmin, mineraller) (53, 80,81).

d) Onarıcı etki: Serbest radikaller tarafından hasar gören biyomolekülleri onarırlar. Hasar görmüş DNA molekülünü tamir eden enzimler bu gruba örnek olarak verilebilir (53,82).

2.2.3.2. Enzimatik Antioksidanlar

Süperoksit Dismutaz (SOD): SOD, substrat olarak serbest oksijen radikallerini kullanan ve süperoksiti hidrojen perokside ve moleküler oksijene dismutasyonunu katalize eden, yapısında bakır, çinko ve manganezin olduğu bir metalloenzimdir ($2 O_2^- + 2 H^+ (SOD) \rightarrow H_2O_2 + O_2$). Oluşan reaksiyon “oksidatif strese karşı ilk savunma” olarak da adlandırılmaktadır. Çünkü, süperoksit zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısıdır. Bu sistem sayesinde hücrel kompartmanlardaki süperoksit düzeyleri kontrol altında tutulur. Aynı zamanda SOD, lipid peroksidasyonunu da inhibe etmektedir. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanan dokularda fazladır. SOD’ın ekstrasellüler aktivitesi çok düşüktür (53).

Katalaz (CAT): Peroksizomlarda bulunan, yapısında hem grubu içerdiğinden bir hemoprotein olarak kabul edilen bir enzimdir. Hidrojen peroksidi su ve oksijene ayrıştırmaktadır ($2H_2O_2 (CAT) \rightarrow 2 H_2O + O_2$). Kan, kemik iliği, karaciğer, böbrek ve müköz membranda yüksek miktarda bulunmaktadır (50, 76).

Glutasyon Peroksidaz (GPx): GPx, hücrelerin sitozollerinde yerleşmiş ve yapısında selenyum bulunan bir metalloenzimdir. Sitozol ve mitokondrilerde SOD tarafından oluşturulan H_2O_2 ve lipid hidroperoksitlerini ortadan kaldırmaktadır. Yalnız kapasitesi sınırlı olup düşük hidrojen peroksit konsantrasyonunda çalışmaktadır. Hidrojen peroksit ve organik peroksitlerin indirgenmesiyle oksitlenen glutasyon, glutasyon redüktaz enzimi ve başlıca pentoz fosfat yolundan sağlanan NADPH yardımıyla indirgenerek reaksiyonların devamını sağlar (53). Eritrositlerde GPx oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GPx aktivitesindeki azalma, H_2O_2 'in artmasına ve şiddetli hücre hasarına neden olur (53).

Glutasyon Redüktaz (GR): Glutasyon peroksidaz tarafından H_2O_2 ve diğer lipit peroksidlerin yükseltgenmesi sırasında glutasyon, okside glutatyona dönüşmektedir. Organizmanın glutasyon deposu sınırlı olduğundan oksidasyona uğramış bu yapıyı ileride yeniden kullanmak için redükte glutatyona dönüştüren enzim glutasyon redüktazdır (53).

Glutasyon-S-Transferazlar (GST): Organizmaya giren ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli görev almaktadırlar. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksidleri olmak üzere lipit hidroperoksidlere karşı GST'ler selenyum bağımsız GSH peroksidaz aktivitesi göstermektedirler. Antioksidan aktivitelerine ek olarak çok önemli başka biyokimyasal fonksiyonlara da sahip olup bilirubin, hem ve bazı kortikosteroidler gibi endojen maddelere geri dönüşümlü olarak bağlanarak bunların hücre içi transportunda da görev almaktadırlar (53,59).

2.2.3.3. Enzimatik Olmayan Antioksidan Savunma Sistemleri

Glutasyon (GSH): Önemli bir intrasellüler antioksidandır ve ekstrasellüler mesafede çok düşük konsantrasyonlarda bulunur. GSH'a antioksidan özelliğini sisteinin tiyol grubu kazandırır. Glutasyon, HO^\cdot ve $O_2^{\uparrow\downarrow}$ gibi reaktif oksijen türevlerinin temizleyicisidir. Serbest radikal ve peroksidlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Demirin Fe^{+2} (ferröz) halde tutulmasını sağlar. Böylece, protein ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller, hatta rejenerasyon olmalarını sağlar. N-asetil sistein hücre membranını geçip hücre içinde sisteine dönerek GSH üretimini artırır.

Vitamin C (Askorbik Asit): Çok güçlü bir indirgeyici ajan olan C vit'i, süperoksit ve hidroksil radikalleri ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler, antiproteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller. C vit'in antioksidan etkisinin yanında pro-oksidan etkisi de söz konusudur. Çünkü, vitamin C, Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeyen süperoksit dışındaki tek hücresel ajandır. Bu yolla askorbik asit proteine bağlı ferrik demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan indirgeyerek Fenton reaksiyonunda H_2O_2 ile etkileşmeye uygun olan ferröz demire dönüştürür. Bu prooksidan etki sadece düşük konsantrasyonlarda görüldüğü daha yüksek konsantrasyonlarda ise güçlü bir antioksidan olarak etki gösterdiği belirtilmiştir (59,62).

Vitamin E (Tokoferol): α -tokoferol, yağda çözünen ve lipid peroksidasyon zincirini kıran bir antioksidandır. Mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi membrandan zengin hücre kısımlarında vitamin E konsantrasyonu artmıştır. Çok güçlü bir antioksidan olan α -tokoferol

hücre membran fosfolipidlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal ataklarına karşı korur, oluşan radikalleri temizler, lipid peroksidasyonunu inhibe eder. Askorbik asit E vitamininin etkisini artırır. E vitamini ve GPx serbest radikal etkisine karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. E vitamini sentezlerini engeller iken GPx oluşmuş peroksitleri ortadan kaldırır.

Vitamin A (β-Karoten): A vitamininin metabolik ön maddesi olan ve yağda çözünen bir antioksidan olan β-karoten son derece güçlü singlet O₂ temizleyicisidir. Serbest radikaller biyolojik hedeflerle interaksiyonuna girmeden önce direkt olarak onları yakalayabilir ve aynı zamanda zincir kıran bir antioksidan olarak etki ederek de peroksit radikalleri oluşumunu engeller (59,62).

Seruloplazmin: Plazma antioksidan aktivitesinin önemli bir kısmı, bakır içeren ve taşıyan akut faz proteini seruloplazminden kaynaklanır. Seruloplazmin oksijen radikal ara ürünleri salınmaksızın ferro-oksidad aktivitesi göstererek Fe⁺²'i Fe⁺³'e okside eder. Böylece Fenton reaksiyonunu ve serbest radikal oluşumunu inhibe eder. Demir ve bakır bağımlı lipid peroksidasyonunu önleyici etki gösterir (8).

Ferritin: Dokulardaki demiri bağlar, serbest radikal reaksiyonlarında yer almasını engeller.

Transferrin ve Laktoferrin: Transferrin dolaşımdaki, laktoferrin lökositlerdeki serbest demiri bağlar, serbest radikal oluşumunu önler.

Haptoglobin ve Hemopeksin: Hemoglobin, gerek dekompozisyonla ortama demir vererek gerekse doğrudan peroksitlerle etkileşerek lipid peroksidasyonunu uyarabilir. Haptoglobin hemoglobini, hemopeksin "hem"i bağlayarak bu demir bileşiklerinin lipid peroksidasyonunu uyarmasını engeller.

Desferrioksamin (DFO): DFO, ferrik demirin güçlü bir bağlayıcısıdır ve oluşan bu kompleksteki demirin indirgenmesi son derece zordur. Bu sayede DFO, demir iyonuna bağımlı lipid peroksidasyonunu önler. DFO, transferrin veya laktoferrine bağlı demir iyonlarını uzaklaştırmada zayıf bir etkinliğe sahiptir.

2.2.4. Total Antioksidan Kapasite

Normal fizyolojik koşullarda organizma, endojen veya eksojen nedenlerle oluşan serbest radikaller ve bunlara bağlı oluşan oksidatif stres ile m¼cadele eden kompleks bir antioksidan defans sistemine sahiptir. V¼cudun oluşan oksidan durumlara karşı redoks ayarını s¼rd¼rebilmesinde kan ¼ok ¼nemlidir. ¼¼nk¼ kan antioksidanların v¼cudun t¼m b¼l¼mlerine taşınmasını ve dağıtımını ger¼ekleřtirmektedir (50).

Total antioksidan kapasiteye en b¼y¼k katkı plazmadaki antioksidan molek¼llerden gelmektedir. Plazmada bilirubin, serbest demiri toplayan transferin ve seruloplazmin, ¼rik asit, E vit'i, C vit'i yanında serbest radikalleri tutan zincir kırıcı antioksidanlarda bulunmaktadır (50,81). Albumin, ¼rik asit, askorbik asit insan plazmasındaki total antioksidan kapasitenin %85'inden fazlasını oluşurmaktadır. Bunun nedeni, kanda bilirubin, glutatyon, flavinoidler, alfa tokoferol ve beta karoten gibi antioksidan sistemin komponentlerine nazaran albumin, ¼rik asit ve askorbik asitin seviyelerinin fazla olmasıdır (50,83).

Plazmada antioksidanlar bir etkileşim i¼inde bulunurlar. Genel olarak bu maddeler sinerjist olarak ¼alıřmaktadırlar. Bu etkileşimden dolayı, bileşenlerin tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla bir etki oluşmaktadır. Bu sinerjizme ¼rnek glutatyonun askorbatı, askorbatın da tokoferol¼n yeniden aktifleşmesini sağlaması g¼sterilebilir. Ayrıca bir antioksidandaki azalma diğerindeki artış ile kompanse edilebilmektedir. ¼r; yenidoğanda postnatal d¼nemde fizyolojik şartlarda plazmada ¼rik asit, C vit'i, ve s¼lfidril grupları azalırken, bilirubin ve E vit'i d¼zeyleri artmaktadır. Total antioksidan kapasitenin ¼l¼m¼, antioksidanların tek tek ¼l¼m¼nden daha değerli bilgiler vermektedir. Bu y¼zden kanın antioksidan durumunu saptamada, bireysel antioksidanlardan ¼ok bunların toplam antioksidan değerini veren toplam antioksidan kapasite ¼l¼m¼ yaygınlaşmaktadır (50,83).

2.3. Talasemi ve Oksidatif Stres

Talasemik eritrositlerin yaşam s¼resinin kısalığı; morfolojik değişiklikler, biyokimyasal ve metabolik dengesizliklerle ilişkilidir (84). β -TM'l¼ hastaların eritrositlerinde hem eksojen hem de endojen oksidatif hasar sıklığı artmıştır (84). Talasemili hastalarda eritrositlerin biyokimyasal ve metabolik değişikliklerle oksidatif strese artmış duyarlılığı; i) Serbest radikallerle oluşan

oksidatif hasar, ii) Lipid peroksidasyonu, iii) Artmış demir toksisitesi, serbest demir salınımı ile bağımlı olduğu kabul edilen görüşlerdir (84, 85).

Eşleşmemiş fazla α globin zincirleri, Non-Hb demiri ve hücre içinde Hb'nin düşük oluşu bu oksidatif stresi kolaylaştıran faktörlerdendir. Özellikle serbest, eşleşmemiş unstable α globin subünitleri oksidatif olaylar zincirini başlatırlar (1,7, 86). Önce metHb oluşur, sonra reversible ve irreversible hemikromlar presipite olurlar ve membranın çeşitli komponentleri ile ilişkiye girerler. Hem ve globülini parçalarlar. Membran iskeletinde bozulma ile, deformabilitede azalma, rijiditede artma, membran lipidlerinde peroksidasyon ve antijenik değişme ile eritrositlerde erken yaşlanma, katyon değişiminde bozulma ile hücre içi potasyum kaybı gibi olaylara da neden olmaktadır.

2.4. Talasemi ve Demir Toksisitesi

Demir; katalaz, akonitaz, ribonukleotid redüktaz, peroksidaz, sitokrom oksidaz gibi enzimlerle redoks kimyasını kullanarak vücuttaki hayati fonksiyonlarda görev alan, Hb ve diğer Fe içeren proteinlerin yapısına giren bir elementtir. Demir, fizyolojik olarak gerekli ama biyokimyasal açıdan oldukça tehlikelidir (47,87). Besinlerdeki Fe'in yaklaşık olarak %10 kadarı emilir, ancak fazla Fe'in atılmasını sağlayan bir mekanizma bulunmamaktadır. Kan transfüzyonları, hemokromatoz ve talasemi gibi bazı anemilerin tedavisi sırasında plazma Fe konsantrasyonu yükselmektedir (88).

Fazla demir sağlıklı organizmada bile toksik olabilir (47). Demir yüklenmiş hücrelerde lizozomal hasar ve proteazların salgılanmasıyla hücre ölümü görülebilir (87). Kalp, KC, eklem, pankreas gibi organ hasarları oluşabilir. Nitekim yüksek doz demir verilen sıçan hepatositlerinde demirin mitokondrilerde depolandığı, matriks boşluğunda amorf yoğunluklu yapıların biriktiği ve mitokondriyumlarda şişme olduğu bildirilmiştir (89). Demir yüklenmiş hayvanların kalpleri normal hayvanların kalplerine göre iskemi-reperfüzyona maruz kaldığında belirgin olarak daha fazla hasara uğrar. Bu olayda en önemli mediatör oksijen radikalleridir. Kalp kasında hücre membranları ve sarkoplazmik membranlar ekstrasellüler sıvı ile doğrudan temas halinde bulunurlar. Membranların demir toksisitesinden aşırı etkilenmesi özellikle kolaylaşmaktadır. İskemi-reperfüzyon olayı demirin mobilize olmasına veya yeniden dağılımına neden olabilir.

Demir ve süperoksit radikali, özellikle de patolojik şartlar altında, birbirleriyle etkileşim halindedir. Bu iki molekülden her biri diğerinin toksisitesini artırıcı etki göstermektedir. Artmış

demirin zararlı etkileri, öncelikle oksijen radikallerinin üretiminde başlıca kaynak ürün olmasıyla açıklanır (89). Aşırı demir yükü, aşırı süperoksit üretimi sonucu, bu maddelerin hasar verici etkisini artırabilir. Diğer taraftan ortaya çıkan kronik oksidatif stres, sitotoksik ve mutajenik olaylara neden olabilir (47,90).

Süperoksit radikallerinin hasar verici etkilerinin ferritinden demirin ayrışmasının azaltılmasıyla zayıflayacağına inanılır. Süperoksit, hidrofilik kanallar boyunca Fe^{+3} 'ün Fe^{+2} 'ye indirgenmesini takiben ferritin molekülüne girer, bu durum ferritinden Fe 'in serbestleşmesini kolaylaştırır. Fe , hücre içinde çeşitli hasar verici reaksiyonları katalizlemek suretiyle çeşitli biyolojik maddelere elektron verir ve alır. Süperoksit radikali ve hidrojen peroksit özellikle serbest demir ve bakır iyonu varlığında hidroksil grubu gibi daha tehlikeli radikallere dönüşmesi nedeniyle, antioksidan savunmayı güçlendirmek amacıyla organizmanın demir ve bakır iyonlarını bağlı duruma getirmesi önemlidir. Normal şartlarda Fe , redoks aktivitesi nedeni ile hücreler ve organizmalar tarafından çok dikkatli bir şekilde tutulur. Yine serbest olmayan demir, sitrat veya ATP gibi bileşiklerle hemen şelat oluşturmaz, fakat bu kompleksler lipid oksidasyonunu veya HO oluşumunu katalizleyen redoks reaksiyonlarına kolayca girer.

Transferin ve ferritin, demiri Fe^{+3} durumda tutarlar ve hücresele indirgeyiciler tarafından Fe^{+3} uzaklaştırılması çok güçtür. Demir transport proteini olan transferin sağlıklı insanlarda % 20-30 oranında demir ile yüklüdür. Böylece plasmadaki serbest iyonik demirin etkinliği sıfıra dek düşer. Transferrine bağlı demir lipid peroksidasyon işlemini yapamaz (8). Sağlıklı insanda depolanmış demirde büyük bir sorun oluşturmaz, ancak hastalık gibi durumlarda süperoksit radikalleri tarafından yapılan saldırıya ferritin açıktır (47). Kısaca, süperoksit anyonları, Fe^{+3} 'in Fe^{+2} 'ye indirgenmesini katalize eder. Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonunda demir, hidrojen peroksit ve süperoksit moleküllerini toksik serbest HO^{\cdot} dönüştürür (53, 91-93). Protein ve DNA'yı da içine alan birçok biyolojik makromolekül bu radikalden etkilenir.

TI'lı hastalarda gastrointestinal artmış demir absorpsiyonu, TM'li hastalarda ise buna ek olarak hayat boyu devam eden kan transfüzyonları demir yüklenmesine neden olur (5,37). Demir önce RES ve kemik iliği makrofajları tarafından tutulur. Kapasite aşılnca önce transferrine demir verilir ve oradan da parankimal hücrelere girerek doku hasarı oluşur. Aşırı demir yüklü olgularda, transferrinin demir taşıma kapasitesi dolmakta ve transferrine bağlı olmayan demir (serbest demir, NTBI) oluşmaktadır. Parankimal hücrelerdeki labil demir havuzu artınca, bir korunma mekanizması olarak, transferrin demirin hücre içine girişi engellenir. Ancak transferine

bağlı olmayan NTBI hücrelere girişi , üstelik transferin demirinden çok daha hızlı olarak devam eder (5,37). Böylece hem yüksek plazma demiri hem de intraselüler non-Hb demirinin artışı oksijenden zengin intraeritrositik çevre ile beraber reaktif oksijen radikallerinin yapımı için uygun ortam oluşturur. Oksidatif stres'e yol açar. Demir yüklenmesi, lipid peroksidasyonu, hepatik hasar ve fibrojenezise neden olur (94).

2.5. Talasemi ve Lipid Peroksidasyonu

Demirin yol açtığı fenton reaksiyonu ile oluşan HO[·] , lipid peroksidasyonunun en önemli nedenlerinden biridir. Lipid peroksidasyonu vücuttaki tüm hücreleri ve organelleri etkilemekte, bir kere başladıktan sonra da, bir antioksidan devreye girmez ise, zincirleme devam etmektedir.

Lipid peroksidasyonunun artması hem akut hem de kronik demir toksisitesinin önemli bir özelliğidir. Demir, Fenton reaksiyonu yoluyla hidroksil radikallerinin oluşmasını sağlarken stabil lipid hidroperoksitlerinin peroksi ve alkoksi radikallerine dönüşümünü hızlandırır. Doymamış yağ asitleri içeren membran lipidleri ve proteinleri demire bağlı peroksidatif hasara aşırı duyarlılık gösterir. Membran lipidlerinde peroksidasyon işlevi hidroksil, alkoksil ve peroksil radikalleri gibi reaktif maddelerin bir metilen grubundan hidrojen atomunu çıkarması ile olur (91,92). Talasemilerde membran fosfolipidlerinden fosfotidil etanol aminin ve poliansature yağ asitlerinin (PUFA) aşırı oksidasyona bağlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca talasemideki hepatik bozukluk da, serumda fosfolipid, kolesterol ve PUFA' nın azalmasına katkıda bulunmaktadır. Yine lipid solubl antioksidanların azalması demir bağımlı karaciğer harabiyetini artırabilir (10). Membran lipidlerinin peroksidatif harabiyetinin önemli bir göstergesi, PUFA'nın oksidasyonu sonucu oluşan, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) konsantrasyonlarının artışıdır (95).

Serbest radikallerin membran fosfolipidleri üzerindeki etkisini sonlandırmada rol alan SOD gibi enzimleri destekleyen, doğal antioksidan, α-tokoferolün (vit E) serum düzeyi, talasemik hastalarda çok düşük bulunmuş, MDA'nın ise arttığı saptanmıştır (7,96,97). Bu eksikliğin fazlaca tüketime bağlı olabileceği vurgulanmıştır. Ağızdan sürekli α-tokoferol verilmesi, serum α-tokoferol düzeyini artırıp, verildiği müddetçe MDA konsantrasyonunu azaltmaktadır. Fakat transfüzyon ihtiyacında bir değişiklik yapmadığı vurgulanmıştır (85). E vit'i sadece membran lipidlerinin peroksidasyonunu önlemekte, oksijen radikallerinin diğer hücre komponentleri üzerine olan etkisini önleyememektedir. Talasemik hastalarda vit E ve vit A'nın

azaldığını, kompanzasyon olarak SOD ve GPx'in arttığı vurgulanmıştır (98,99). Hastanın yetersiz şelasyon tedavisi alması antioksidanları azaltabileceği vurgulanmıştır (100).

2.6. Talasemi ve DNA Hasarı

Hem demir hem de oksidatif stresin mutagenез ve karsinogenez ile olan ilişkileri değişik çalışmalar ile kanıtlanmıştır (Süperoksidin üretiminde artma, temizlenmesinde azalma veya artmış hücresel uptake, azalmış depo ve süperoksit artışına sekonder redoks aktif demir miktarında artma). Demir tuzlarının in vitro olarak, rat karaciğerinin nukleus veya mitokondrisinden izole edilen DNA'da tek sarmal kırıklara neden olduğu gösterilmiştir (101,102). Memeli hücrelerinde yapılan deneysel çalışmalarda hidrojen peroksit bağı DNA hasarında demirin anahtar rol oynadığı ve bu hasarın demir şelatör tedaviler ile azaltılabileceği belirtilmiştir (103-105). Süperoksid ve hidrojen peroksidin DNA'ya bağı demir yardımıyla hidroksil radikallerinin oluşumunu katalizlediği ve DNA hasarına neden olabileceği in vivo olarak gösterilmiştir (105). Yine demir varlığında lipid peroksidasyon ürünleri HO[•] etkisini içeren bir mekanizmayla DNA hasarına neden olabilirler (106).

Hereditör hemokromatozis (HH) ve talasemi gibi hemolitik anemilerde vücutta artmış bir demir yükü vardır. HH'lu hastalarda uzun süreli demir birikiminin hepatosellüler karsinoma gelişme riskini arttırdığı belirtilmiştir (107-108). Demir bağımlı oksidatif hasarın hepatik DNA'yı etkilemesi hepatosellüler karsinoma oluşumunda katkıda bulunmaktadır (109).

Hereditör hemokromatozisli hastalar gibi talasemili hastalarda da artmış demir, aşırı süperoksit üretimi sonucu, kronik oksidatif stres yoluyla sitotoksik ve mutajenik olaylara neden olabilir (47,90).

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Hematoloji Bilim Dalı takibinde olan yaşları $7,34 \pm 4,21$ yıl (9 ay-18 yıl) arasında değişen 83 (50 erkek ve 33 kız) transfüzyon bağımlı β -TM hasta ile yaş ortalaması $8,57 \pm 3,53$ (1-15) yıl arasında değişen, 40 (29 erkek ve 11 kız) anemik olmayan sağlıklı çocuk grubunda Haziran 2007-Haziran 2008 tarihleri arasında yapıldı. Çalışma için Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik kurulunun onayı alındı. Bu çalışma Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (HUBAK) tarafından desteklendi. Çocuklar ve/veya ebeveynlerinden kan örnekleri alınmada bilgilendirilmiş olur alındı.

Hastalara β -TM tanısı; aneminin başlangıç yaşı, fizik bulgular, kan sayımı bulguları, periferik yaymada hemolizin özellikleri, Hb elektroforezi, ve ebeveynlerde talasemi taşıyıcılığının bulunması ile konuldu. Tanıda moleküler genetik teknik kullanılmadı. HbsAg, HCV ve HIV seropozitifliği olması çalışmadan çıkarılma kriteri idi. Hastaların tümü düzenli olarak ayda bir veya iki kez muayene edildi. β -TM'lü olgulara; transfüzyon öncesi Hb düzeyleri 9,5-11,5 g/dl olacak şekilde, 3-5 hafta aralıklarla, ABO-Rh(D) uygun eritrosit süspansiyonu 10-20 ml/kg dozda ve 2 saat içinde verildi.

β -TM'lü hastaların takip dosyaları incelenerek splenektomi oranı, transfüzyon sayıları, transfüzyon alma süreleri, ortalama şelasyon süreleri hesaplandı. β -TM'lü hastalar şelasyon tedavisi olarak DFO ve DFP aldılar. DFO; 30-40 mg/kg dozda, desferrioksamin pompası ile 8-12 saatte subkutan infüzyon yoluyla genelde geceleri haftanın 5-7 günü, infüzyondan hemen önce 100 mg C vitamini ile beraber önerildi. Deferipron, günde 3 defa 25 mg/kg vücut ağırlığı dozda, toplam 75 mg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde oral yolla kullanıldı. Hastalarımız şelasyon tedavisini düzenli ve/veya yeterli almıyorlardı. Hiçbir hastamız antioksidan suplementasyonu olarak E vitamini kullanmıyordu.

3.1. Örneklerin hazırlanması ve ölçümler

Kan örnekleri, β -TM'lü hastalar transfüzyon için hastanemize başvurduklarında son transfüzyondan en az 3 hafta geçmiş olduğunda ve son şelasyon dozundan 48 saat geçtikten sonra ve eritrosit süspansiyonu transfüzyonu yapılmadan önce vakumlu vacutainer tüpler kullanılarak EDTA'lı, jelli biyokimya ve heparinli tüplere açlık venöz kan olarak alındı.

EDTA'lı kan örneklerinde Harran Üniversitesi Araştırma Hastanesi Biyokimya laboratuvarındaki otomatik kan sayım cihazı (Celldyn 3700) kullanılarak tam kan ve retikülosit sayımı yapıldı.

Hasta ve kontrol grubundan jelli biyokimya tüplerine alınan kan örnekleri Hettich marka soğutmalı santrifüj cihazında 3000 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek serumlar ayrıldı. Ayrılan serumlarda rutin biyokimya parametreleri çalışıldıktan sonra artan serumlar -80°C'de total antioksidan kapasite (TAK) ve total oksidan seviye (TOS) çalışılmak üzere depolandı.

Serum ferritin düzeyi rutin biyokimya laboratuvarında elektrokemiluminisans yöntemle (Roche E-170 cihazı) ölçüldü.

Serum demir, IUBC, trigliserid, kolesterol, HDL-Kolesterol, LDL-Kolesterol düzeyleri ve diğer biyokimyasal parametreler biyokimya kitleri kullanılarak otomatik Aeroset analizörü (Abbott) ile spektrofotometrik yöntem yardımıyla çalışıldı.

Heparinli tüplere alınan kan örneklerinde mononükleer lökosit DNA hasarı çalışılmak üzere işleme kondu.

3.2. Mononükleer Lökositlerin Seperasyonu

Bir ml histopaque-1077 üzerine bir ml taze heparinize kan yavaşça konup 2100 rpm ve 25°C'de 30 dakika santrifüj edildi. Orta tabakada biriken mononükleer lökositler pipet yardımıyla alınıp bir ml tuzlu fosfat tamponu (pH=7.4) ile karıştırıldıktan sonra 1600 rpm ve 25°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki süpernatant atılıp pellet tuzlu fosfat tamponu (pH=7,4) ile 10⁶ mononükleer lökosit / μ l olacak şekilde dilüe edildi.

3.3. Comet Assay (alkali mononükleer hücre elektroforezi) Yöntemi ile DNA Hasar Tayini (mDNA hasarı)

Comet assay; hızlı, basit ve hücresele düzeyde uygulanması kolay, genotoksisite ve olası endojen DNA hasarını iyi tanımlayan bir tekniktir (110-115).

Yöntemin Prensipleri: Comet assay yöntemi alkali pH da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüke sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı göç etmeleri esasına dayanmaktadır. Tek hücreler veya çekirdekçikler agarozaya yerleştirilir ve lizisten sonra zarar görmemiş DNA'lar taşınma sırasında comet (kuyruk) oluşturmazlar. Oysa DNA fragmente

oluşmuşsa fragmentler (nükleik asitler) farklı moleküler ağırlıklara ve farklı elektrik yüklerine sahip olacaklarından elektriksel alanda farklı hızlarda hareket ederek kuyruk şeklinde bir görüntü oluştururlar.

Yönteminin Uygulanışı

Slaytların Hazırlanması: %1,0 'lik NMP agaroz jel hazırlanarak 100 µl jel kenarları buzlanmış lam üzerine damlatıldı ve üzeri lamel ile kapatılarak buzdolabında (2-4 °C) 5 dakika bekletildikten sonra lamelleri kaldırıldı. Hazırlanan lamlar nemli kutularda bekletildi. PBS (Fosfat buffered saline) ile mm³' te 10⁴ hücre olacak şekilde dilüe edilmiş mononükleer hücrelerden 10 µl alınarak 80 µl %0,7'lik low melting point (LMP) agaroz jel (37 °C) ile karıştırılarak birinci tabaka üzerine tabakalandırıldı ve tekrar lamel ile kapatılarak buzdolabında donması için 5 dakika bekletildi.

Lizis aşaması: Agaroz jel kurduktan sonra slaytlar yaklaşık bir saat süre ile yüksek konsantrasyonda tuz ve deterjan içeren soğuk lizis solüsyonunda bekletilerek hücre ve çekirdek zarı lizise uğratıldı. Lizis solüsyonunun içeriği 100 mM EDTA, 2,5 M Sodyum klorid, 10 mM trizma base'dan oluşmaktadır. Çalışmadan hemen önce %1 oranında triton X-100 ve %10 oranında DMSO karıştırılıp soğutulduktan sonra kullanıldı.

Elektroforez Tamponu: Elektroforezde yürütmeden önce DNA zincirlerinin ayrılması için slaytlar alkali elektroforez tamponunda (1mM EDTA, 300 mM sodyum hidroksit ve pH= 13) 30 dakika inkübasyona bırakıldı.

Elektroforezde Yürütme: Alkali elektroforez tamponunda inkübasyon tamamlandıktan sonra DNA'lar bu tampon çözeltisi içerisinde 300 mA, 17 volt'luk elektriksel alanda ve 5–25 °C'de 30 dakika yürütüldü.

Nötralizasyon: Elektroforezde yürütme işlemi tamamlandıktan sonra alkali tampon çözeltisini ortamdaki uzaklaştırmak için slaytlar 3 dk süre ile 3 kez nötralizasyon tamponu ile (0.4 M Tris-HCL, pH 7.5) yıkandı.

Boyama: Nötralizasyon işlemi tamamlandıktan sonra boyama işlemine geçildi. Boyama işlemi için floresan boya olan etidyum bromit boyası (5 µg/ml) kullanıldı. Her bir slayt için 80 µL boya slayt üzerine damlatıldıktan sonra lamel ile üzeri kapatılarak 20 büyütme floresan mikroskop (Nikon, Tokyo, Japonya) ile (Eksitasyon DB: 546 nm, Emisyon DB: 580 nm) 50 adet DNA görüntüsü değerlendirildi.

Analiz: Bu yöntemde DNA migrasyonu vizüel olarak değerlendirildi. Oluşan hasarın derecesine göre DNA'lar beş kategoriye ayrıldı. Hiç hasar bulunmayan DNA'lar Class 0, maksimum hasar olan DNA'lar ise Class 4 olarak değerlendirildi.

Değerlendirilen 50 hücreye ait DNA'lardaki hasar dereceleri tespit edilip çıkan sonuç 2 ile çarpıldı ve değerlendirme 100 üzerinden yapılmış oldu. Dolayısıyla bu değerlendirmede en yüksek değer 400 olabilecektir.

Migrasyonun uzunluğu fragmentlerin miktarına, DNA zincir kırılmalarına ve alkali-labil bölgelerin seviyelerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

3.4. Total Antioksidan Kapasite (TAK)

Erel tarafından geliştirilen tam otomatik kolorimetrik bir yöntem olup, güçlü serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan kapasitesini ölçen bir metoddur (116).

Reaktif 1: 75 mM Clark tamponu (pH=1.8) içerisinde 10 mM o-Dianisidine ve 45 µmol $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözülerek hazırlandı.

Reaktif 2: 7,5 mM hidrojen peroksit 75 mM Clark tamponu (pH=1.8) içerisinde karıştırılarak hazırlanır.

Prensip: Fe^{2+} -o-dianisidine kompleksi hidrojen peroksit ile Fenton tipi reaksiyon oluşturarak OH radikalini oluşturur. Bu güçlü reaktif oksijen türü indirgenerek düşük pH'da renksiz o-dianisidine molekülü ile reaksiyona girerek sarı-kahverengi dianisidyl radikallerini oluştururlar. Dianisidyl radikalleri ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak renk oluşumunu arttırmaktadır. Ancak örneklerdeki antioksidanlar bu oksidasyon reaksiyonlarını bastırarak renk oluşumunu durdurmaktadırlar.

3.5. Total Oksidant Seviye (TOS)

Erel tarafından geliştirilen tam otomatik kolorimetrik bir yöntemdir (117).

Reaktif 1: 140 mM'lık NaCl çözeltisi içerisinde 25 mM H_2SO_4 çözülerek ana solüsyon hazırlanır. Ana solüsyonda önce % 10 oranında gliserol çözülüp daha sonra total volümde 250 µM Xlenol orange çözülerek hazırlanır.

Reaktif 2: Ana solüsyon içerisinde önce 10 mM o-Dianisidine dihidrochloride çözülüp sonra 5 mM amonyom ferröz sülfat çözülerek reaktif hazırlanır.

Prensip: Örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidine kompleksini ferrik iyonu oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda xylenele orange ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir .

3.6. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Total Oksidant Seviye (TOS) / Total Antioksidan Kapasite (TAK) şeklinde bölünerek Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) hesaplandı (116,117).

3.7. Lipid hidroperoksidasyonu (LOOH)

LOOH tayini, Khelifa Arab ve Jean – Paul. Steghens' in tam otomatik yöntemiyle, xylenele orange ve demir oksidasyonunun kullanılmasıyla ölçüldü (118).

3.8. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler ve şekiller SPSS 11,5 programı kullanılarak gerçekleştirildi. Değerler mean±SD (ortalama±standart sapma) olarak verildi. İstatistiksel olarak $p < 0.05$ değeri gruplar arasındaki farklılıklarda anlamlı olarak kabul edildi. İstatistiksel analiz olarak Student's *T* testi, Man-Whitney-U testi, Chi-square, Pearson's korelasyon testleri kullanıldı.

4. BULGULAR

Çalışmaya yaş ortalaması 7,34 ±4,21 yıl (9 ay-18 yıl) arasında değişen transfüzyon bağımlı 83 β-TM hasta ile yaş ortalaması 8,57±3,53 (1-15) yıl arasında değişen anemik olmayan 40 sağlıklı çocuk alındı. β-TM'li çocukların 50'si erkek (%60,2) ve 33'ü kız (%39,8), kontrol grubunun ise 29'u erkek (%72,5) ve 11'i kız (%27,5) idi. Yaş ve cinsiyet açısından β-TM ve kontrol grubu arasında istatistiksel farklılık saptanmadı (sırasıyla p>0.05; x²=1,766, p=0.184). β-TM ve kontrol grubumuzun BMI değerleri sırasıyla 16,82±1,91 ve 16,02±1,08 idi (p=0,015). β-TM ve kontrol grubumuzun demografik verileri Tablo 4'de sunulmuştur.

Tablo 4: β-TM ve kontrol grubumuzun yaş, cinsiyet ve BMI değerleri dağılımı.

	Hasta (n:83)	Kontrol (n:40)	P değeri
Yaş (Yıl)*	7,34 ± 4,21 ^a	8,57 ± 3,53 ^a	>0,05
Cinsiyet (E/K)**	50 / 33	29 / 11	>0,05
BMI (kg/m ²)***	16,82 ± 1,91 ^a	16,02 ± 1,08 ^a	=0,015

^a Mean±SD olarak verilmiştir. *Mann-Whitney U, **Chi-square testi, ***Student testi kullanıldı.

β-TM tanısı ile takibimizde olan 83 hastamız, 68 ebeveyn (11 ebeveyn ikişer çocuk, iki ebeveyn 3 çocuk) gelmekteydi. Hastalarımızın 48'si (%57,8), Şanlıurfa/Merkez'den, 8'i (%9,6) Şanlıurfa/Siverek ilçesinden, 9'u (%10,8) Şanlıurfa/Harran ilçesinden, 6'sı (%7,2) Şanlıurfa/Akçakale ilçesinden, 4'ü (%4,8) Şanlıurfa/Bozova ilçesinden, 3'ü (%3,6) Şanlıurfa/Suruç ilçesinden, 2'si (%2,5) Şanlıurfa/Viranşehir ilçesinden, 2'si (%2,5) Şanlıurfa/Hilvan ilçesinden, 1'i (%1,2)Şanlıurfa/ Ceylanpınar ilçesinden gelmekteydi.

Hastalarımızın aldıkları ortalama transfüzyon sayısı 90,22±71,83 ünite, ortalama transfüzyon alma süresi 6,35±3,98 yıl idi. Hastalarımızın eritrosit transfüzyonu öncesi ortalama Hb değerleri 8.11±1.47 g/dl idi. Talasemi olgularımızın 17'sine (%20,5) splenektomi yapılmıştı (Tablo 5).

Tablo 5: β -TM'lü olgularımızın klinik karekteristikleri ve transfüzyon özellikleri.

Özellik	Mean±SD	(Min-Max)
Karaciğer (kosta kenarından itibaren)	1.75 ± 2.8 cm	(0-13)
Dalak (kosta kenarından itibaren)	2.83± 3.81 cm	(0-14)
Splenektomi (n / %)	17 (%20,5)	
Pretransfüzyon Hb (g/dl)	8.11±1.47	(4.68-12.30)
Transfüzyon sayısı(Ü)	90,22±71,83	(6-301)
Transfüzyon (yıl)	6,35±3,98	(6ay-15,5 yıl)
Ortalama şelasyon süresi (yıl)	1,94±2,70	(0-13) yıl

β -TM ve kontrol grubumuzun biyokimyasal kan parametreleri Tablo 6' da sunulmuştur.

Tablo 6: β -TM ve kontrol grubumuzun bazı biyokimyasal kan parametreleri.

	Hasta	Kontrol	p değeri
Demir (μ g/dl)	162,95±64,03	76,05±22,07	<0,001
IUBC (μ g/dl)	31,47±38,76	215,06±78,63	<0,001
Ferritin(ng/ml)	3271,15±1809,63	36,44±19,82	<0,001
AST(U/L)	51,06±27,94	28,19±7,08	<0,001
ALT(U/L)	57,34±41,49	22,72±5,40	<0,001
TG (mg/dl)	156,91±66,62	129,46±63,70	=0,044
Kolesterol (mg/dl)	109,48±25,62	168,50±41,96	<0,001
HDL-Kol (mg/dl)	25,64±5,86	49,87±11,35	<0,001
LDL-Kol (mg/dl)	53,42±22,72	90,02±28,48	<0,001

Değerler mean±SD olarak verilmiştir. AST:Aspartat transaminaz, ALT:Alanin Transaminaz, TG: Triglicerid, HDL-Kol: Yüksek Dansiteli lipoprotein-Kolesterol, LDL-Kol: Düşük Dansiteli lipoprotein-Kolesterol.

β -TM'lü olgularımızın aldıkları demir şelasyon tedavilerine göre dağılımı Tablo 7'de görülmektedir. Hastalarımızın %41'i şelasyon almaz iken (9'u şelasyon başlanmadığı için, 25'i ise şelasyon önerildiği halde kullanmayan) %59'u desferrioksamin, deferipron veya iki şelatörde beraber kullanmakta idi (Tablo 7).

Tablo 7: β -TM'lü olgularımızın şelasyon tedavilerine göre dağılımı.

	B-TM (n)	%
DFO	5	6
DFR	13	15,7
DFO+DFR	31	37,3
Şelasyonsuz	34	41

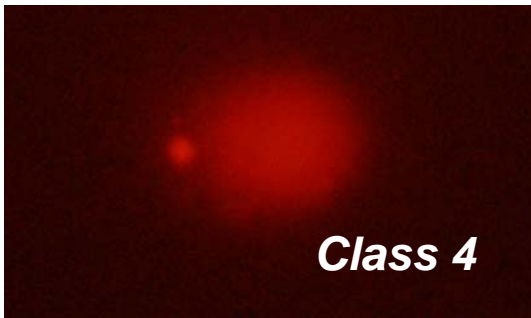
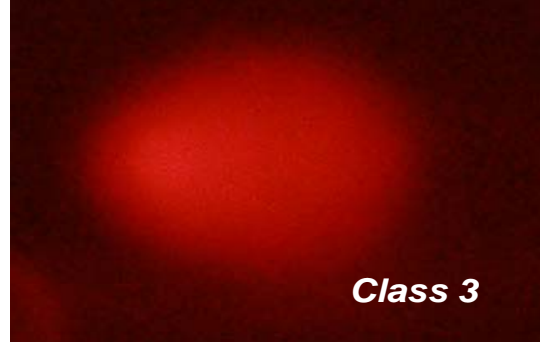
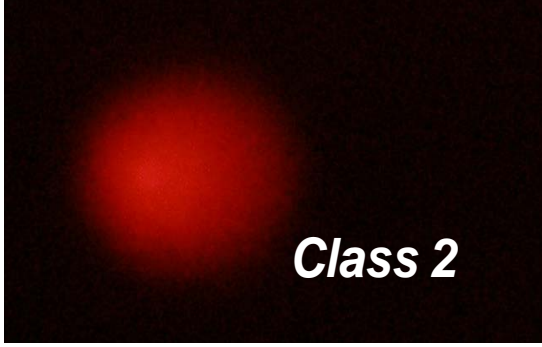
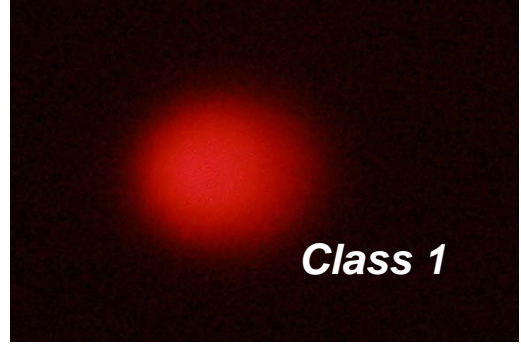
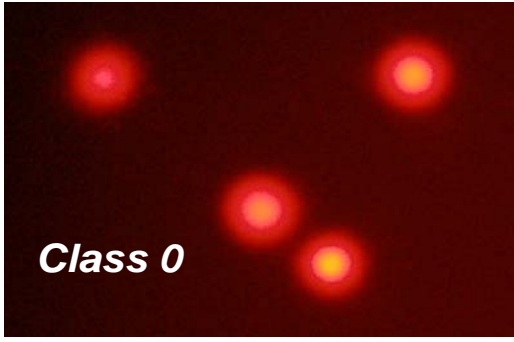
DFO:Desferrioksamine , DFP: Deferiprone

β -TM'lü hasta ve kontrol grubumuzun comet assay tekniği kullanılarak elektroforez migrasyonu sonrası gözlenen flouresan mikroskop görüntüleri değerlendirildiğinde hasta grubumuzda DNA hasarı artmış olduğu saptandı (Tablo 8, Şekil 1-2). Oksidan-antioksidan sistem değerlendirmesinde hasta grubumuzda TOS, OSİ ve LOOH düzeylerinin kontrol grubuna göre arttığı, TAK'in azaldığı saptandı (Tablo 8, Şekil 3-6).

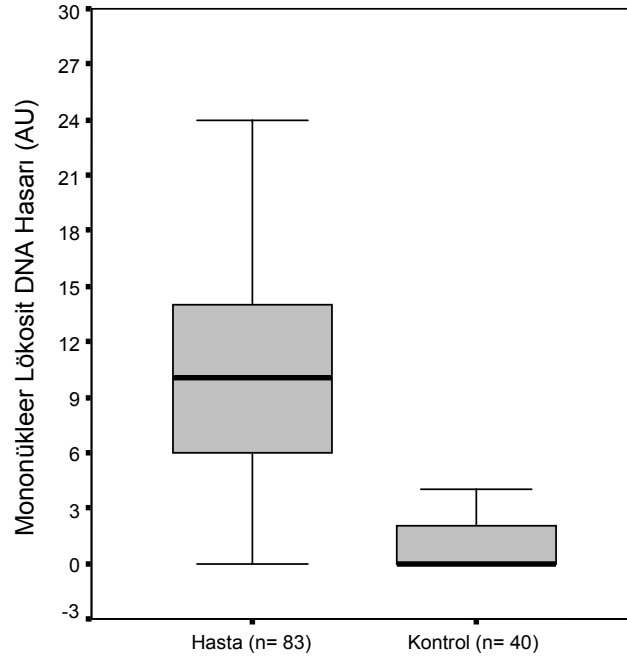
Tablo 8: β -TM ve kontrol grubu olgularımızın DNA hasarı ve oksidatif stres parametrelerin karşılaştırılması.

	Hasta (n=83)*	Kontrol (n= 40)*	p değeri
DNA hasarı (Arbitrary Unit)	10,65±6,58	1,45±2,02	<0.001
TOS (μ mol H ₂ O ₂ Eqv./L)	15,98±9,44	7,18±3,74	<0.001
TAK (mmol Trolox Eqv./L)	1,62±0,27	1,76±0,38	=0,018
OSİ (Arbitrary Unit)	11,11±8,42	4,66±3,46	<0.001
LOOH (μ mol H ₂ O ₂ Eqv./L)	5,44±1,80	2,44±0,86	<0.001

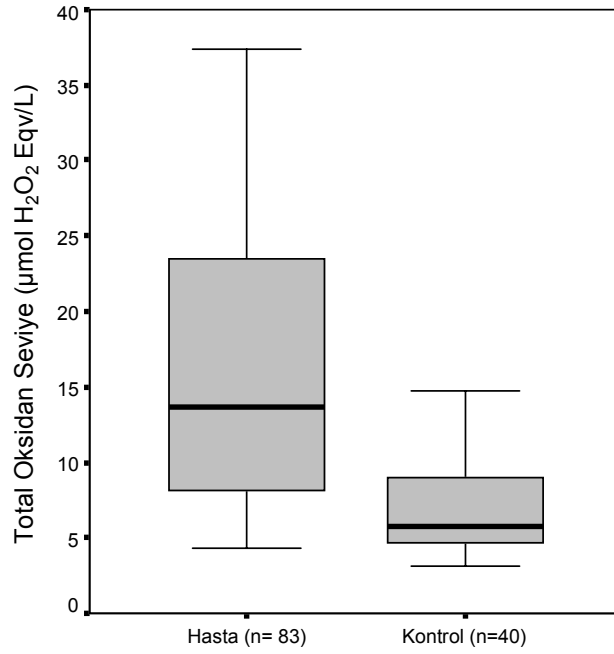
* Değerler mean±SD olarak verilmiştir.



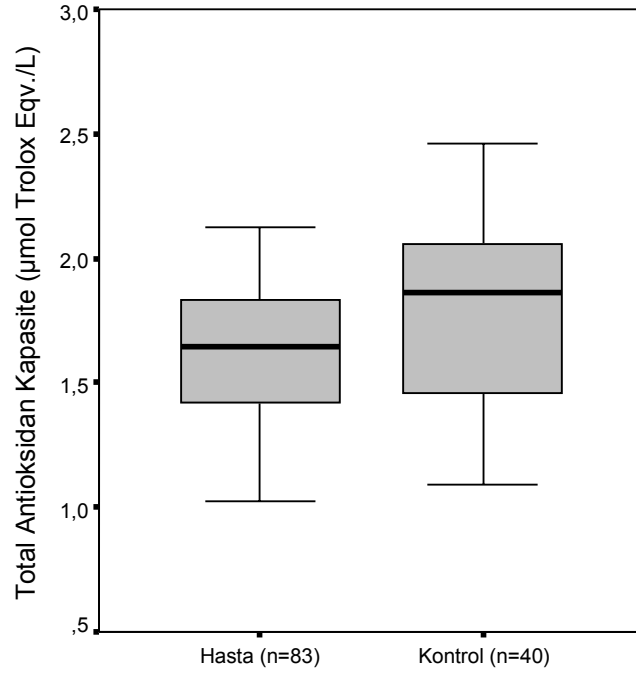
Şekil 1. Olgularımızın DNA'larındaki farklı derecedeki hasarların elektroforez migrasyonu sonrası flouresan mikroskop görüntüleri .



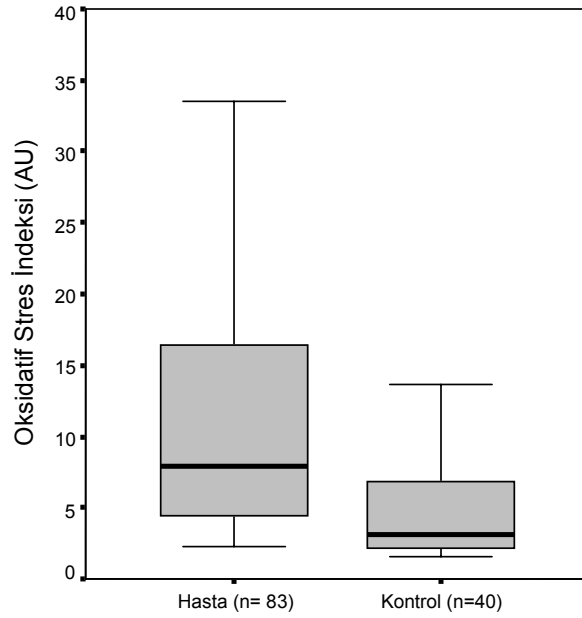
Şekil 2: β -TM'li hasta ve kontrol gruplarının DNA hasarı düzeyleri.



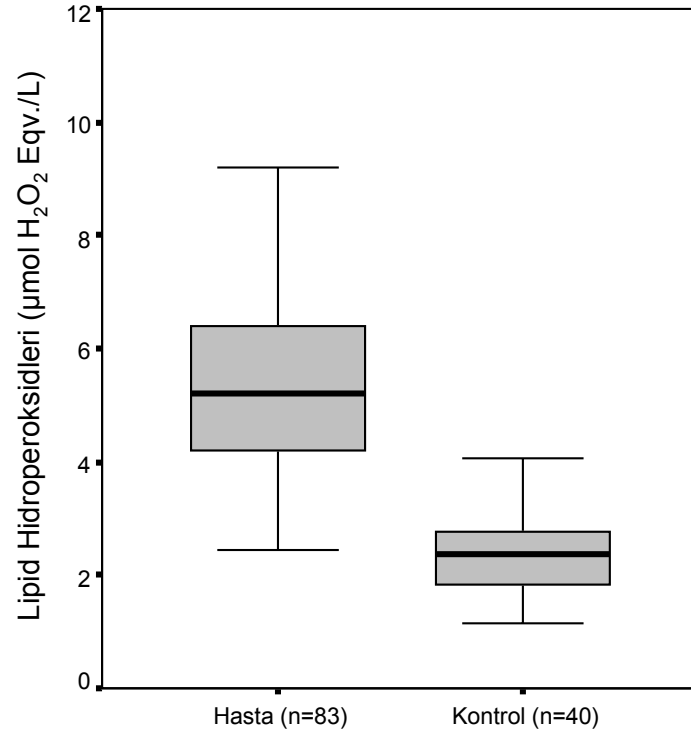
Şekil 3: β -TM'li hasta ve kontrol gruplarının TOS düzeyleri.



Şekil 4: β -TM'lü hasta ve kontrol grublarının TAK düzeyleri.



Şekil 5: β -TM'lü hasta ve kontrol grublarının OSİ düzeyleri.



Şekil 6: β -TM'lü hasta ve kontrol grublarının LOOH düzeyleri

Tablo 9: β -TM'lü hastalarımızın DNA hasarı, oksidan-antioksidan sistem ve bazı biyokimyasal değerler ile transfüzyon alma sürelerine ait korelasyon değerleri.

	Ferritin	DNA Hasarı	TOS	TAK	OSİ	LOOH	AST	ALT	TG	HDL-Kol	LDL-Kol	Tx (Yıl)
Demir												
<i>r</i>	0,358	0,236	0,323	-0,260	0,317	0,214	0,351	0,397	0,107	0,034	0,092	0,305
<i>p</i>	0,001	0,032	0,003	0,018	0,004	0,052	0,001	<0,001	0,347	0,762	0,427	0,005
Ferritin												
<i>r</i>		0,270	0,395	-0,354	0,393	0,274	0,489	0,603	0,257	-0,086	0,167	0,395
<i>p</i>		0,014	<0,001	0,001	<0,001	0,012	<0,001	<0,001	0,021	0,447	0,146	<0,001
DNA Hasarı												
<i>r</i>			0,347	-0,310	0,314	0,414	0,242	0,261	0,037	0,024	0,047	0,160
<i>p</i>			0,001	0,004	0,004	<0,001	0,030	0,018	0,747	0,831	0,686	0,148
TOS												
<i>r</i>				-0,865	0,986	0,601	0,192	0,254	0,155	-0,117	-0,001	0,147
<i>p</i>				<0,001	<0,001	<0,001	0,087	0,022	0,171	0,302	0,993	0,183
TAK												
<i>r</i>					-0,889	-0,407	-0,211	-0,293	-0,133	0,166	0,106	-0,146
<i>p</i>					<0,001	<0,001	0,058	0,008	0,238	0,140	0,359	0,189
OSİ												
<i>r</i>						0,569	0,189	0,260	0,165	-0,104	0,003	0,118
<i>p</i>						<0,001	0,091	0,019	0,143	0,357	0,981	0,290
LOOH												
<i>r</i>							0,147	0,186	0,027	-0,089	0,137	0,185
<i>p</i>							0,190	0,096	0,812	0,431	0,233	0,093
AST												
<i>r</i>								0,880	0,023	0,047	0,152	0,309
<i>p</i>								<0,001	0,839	0,679	0,188	0,005
ALT												
<i>r</i>									0,052	0,051	0,258	0,302
<i>p</i>									0,646	0,651	0,023	0,006
TG												
<i>r</i>										-0,140	-0,246	0,079
<i>p</i>										0,215	0,031	0,484
HDL-Kol												
<i>r</i>											0,602	-0,031
<i>p</i>											<0,001	0,782
LDL-Kol												
<i>r</i>												-0,011
<i>p</i>												0,921

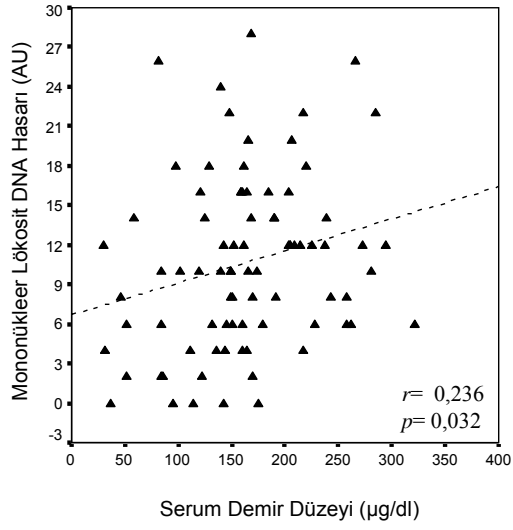
TOS: Total oksidan seviye, TAK: Total antioksidan kapasite, OSİ: Oksidatif Stres İndeksi, LOOH: Lipid hidroperoksid, TG: Trigliserid, HDL-Kol: Yüksek Dansiteli lipoprotein-Kolesterol, LDL-Kol: Düşük Dansiteli lipoprotein-Kolesterol, Tx : Transfüzyon , AST: Aspartat transaminaz, ALT: Alanin Transaminaz.

β -TM'lü olgularımızda serum demir düzeyi ile sırasıyla ferritin, DNA hasarı, TOS, OSİ, AST, ALT ve transfüzyon yılı arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon ($r=0,358$, $p=0,001$; $r=0,236$, $p=0,032$; $r=0,323$, $p=0,003$; $r=0,317$, $p=0,004$; $r=0,351$, $p=0,001$; $r=0,397$, $p<0,001$; $r=0,305$, $p=0,005$); TAK ile istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon saptandı ($r=-0,260$, $p=0,018$) (Tablo 9, Şekil 7-13) .

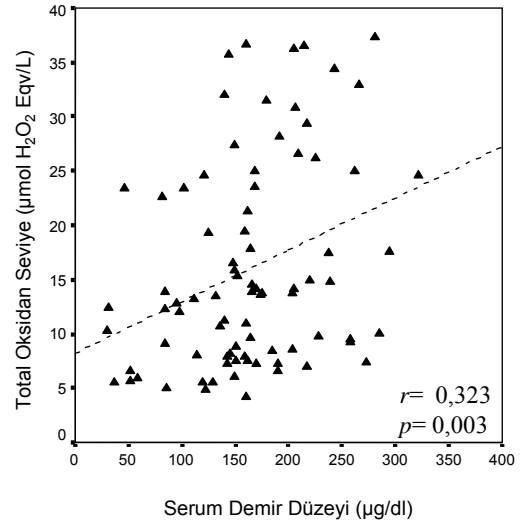
Yine β -TM'lü olgularımızda serum ferritini ile sırasıyla DNA hasarı, TOS, OSİ, LOOH, AST, ALT, TG ve transfüzyon yılı arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon ($r=0,270$, $p=0,014$; $r=0,395$, $p<0,001$; $r=0,393$, $p<0,001$; $r=0,274$, $p=0,012$; $r=0,489$, $p<0,001$; $r=0,603$, $p<0,001$; $r=0,257$, $p=0,021$; $r=0,395$, $p<0,001$) TAK ile istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon saptandı ($r=-0,354$, $p=0,001$) (Tablo 9, Şekil 14-21).

β -TM'lü olgularımızda DNA hasarı ile sırasıyla TOS, OSİ, LOOH, AST ve ALT arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon ($r=0,347$, $p=0,001$; $r=0,314$, $p=0,004$; $r=0,414$, $p<0,001$; $r=0,242$, $p=0,030$; $r=0,261$, $p=0,018$); TAK ile istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon saptandı ($r=-0,310$, $p=0,004$) (Tablo 9, Şekil 22-27) .

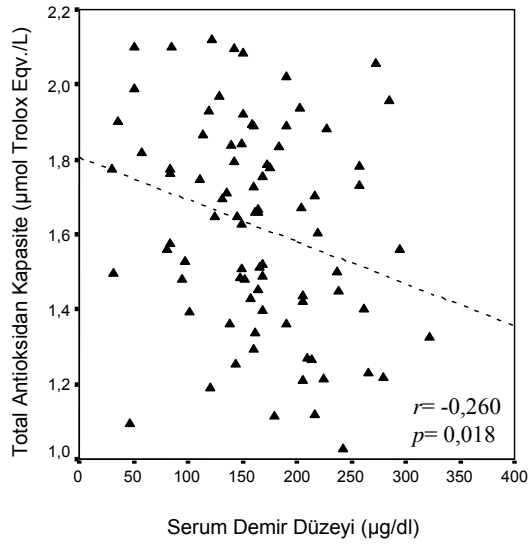
β -TM'lü olgularımızda TOS ile sırasıyla OSİ, LOOH ve ALT (Şekil 28), arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon ($r=0,986$, $p<<0,001$; $r=0,601$, $p<0,001$; $r=0,254$, $p=0,022$); TAK ile istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon saptandı ($r=-0,865$, $p<0,001$) (Tablo 9) . β -TM'lü olgularımızda TAK ile sırasıyla OSİ, LOOH ve ALT (Şekil 29) arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon saptandı ($r=-0,889$, $p<0,001$; $r=-0,407$, $p<0,001$; $r=-0,293$, $p=0,008$) (Tablo 9) . β -TM'lü olgularımızda OSİ ile sırasıyla LOOH ve ALT (Şekil 30) arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptandı ($r=0,569$, $p<0,001$; $r=0,260$, $p=0,019$) (Tablo 9) . β -TM'lü olgularımızda ALT ile sırasıyla LDL-Kol ve transfüzyon süresi (Şekil 31) arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptandı ($r=0,258$, $p=0,023$; $r=0,302$, $p=0,006$) (Tablo 9) . β -TM'lü olgularımızda AST ile sırasıyla ALT ve transfüzyon süresi (Şekil 32) arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptandı ($r=0,880$, $p<0,001$; $r=0,309$, $p=0,005$) (Tablo 9) . β -TM'lü olgularımızda TG ile LDL-Kol arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon ($r=-0,246$, $p=0,031$), HDL-Kol ile LDL-Kol arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptandı ($r=0,602$, $p<0,001$) (Tablo 9) .



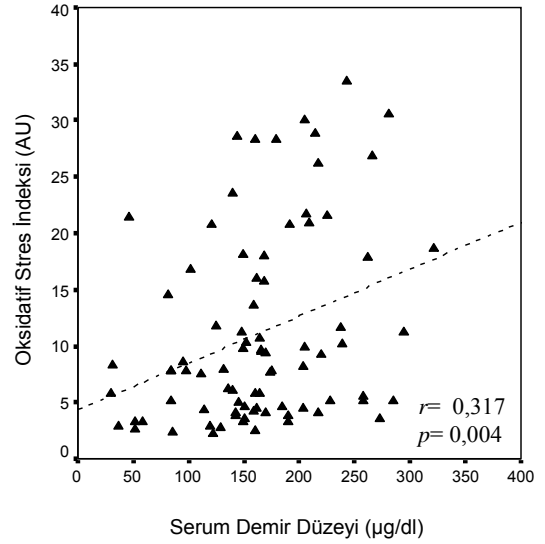
Şekil 7: β -TM'li olgularımızın serum demir düzeyi ile DNA hasarı korelasyon grafiği.



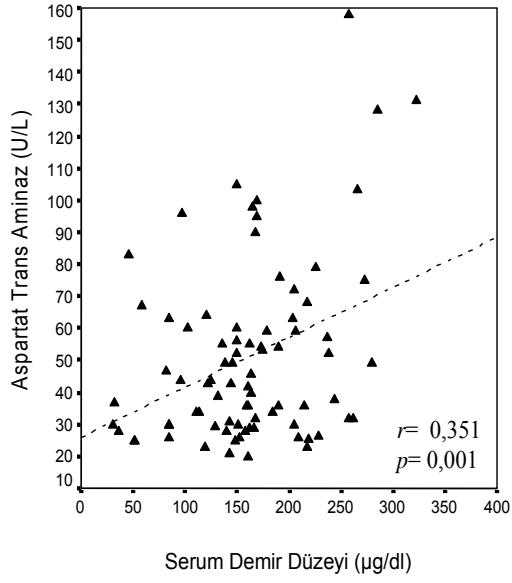
Şekil 8: β -TM'li olgularımızın serum demir düzeyi ile TOS arasındaki korelasyon grafiği.



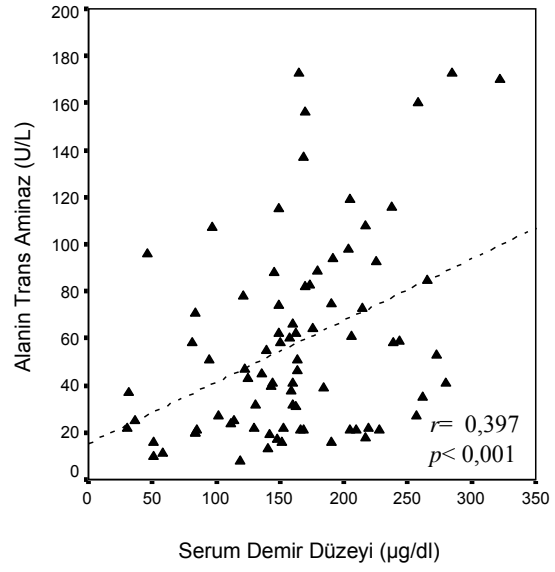
Şekil 9 : β -TM'li olgularımızın serum demir düzeyi ile TAK arasındaki korelasyon grafiği.



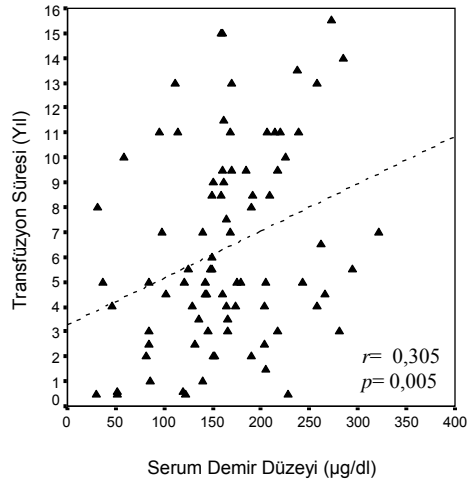
Şekil 10: β -TM'li olgularımızın serum demir düzeyi ile OSİ arasındaki korelasyon grafiği.



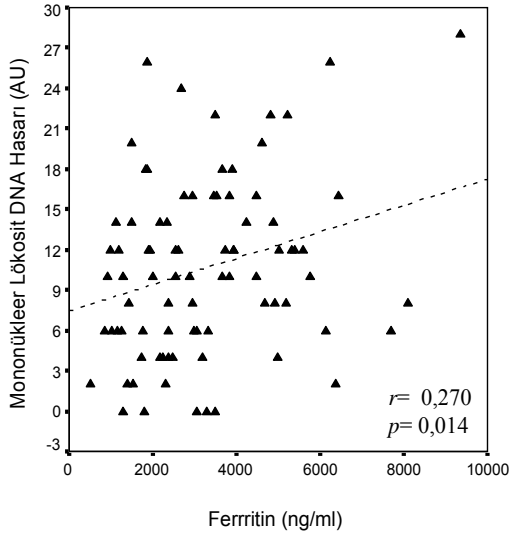
Şekil 11: β -TM'li olgularımızın serum demir düzeyi ile AST arasındaki korelasyon grafiği.



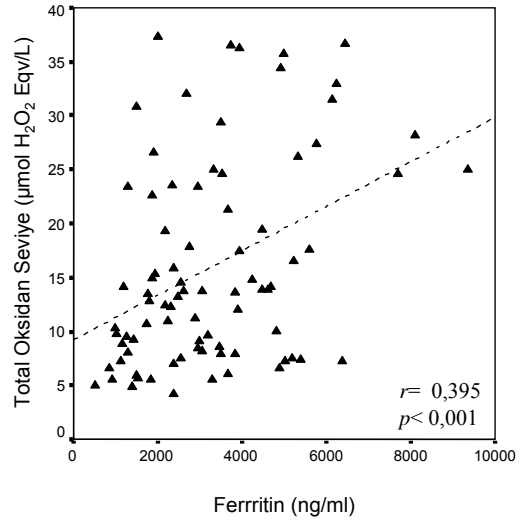
Şekil 12: β -TM'li olgularımızın serum demir düzeyi ile ALT arasındaki korelasyon grafiği.



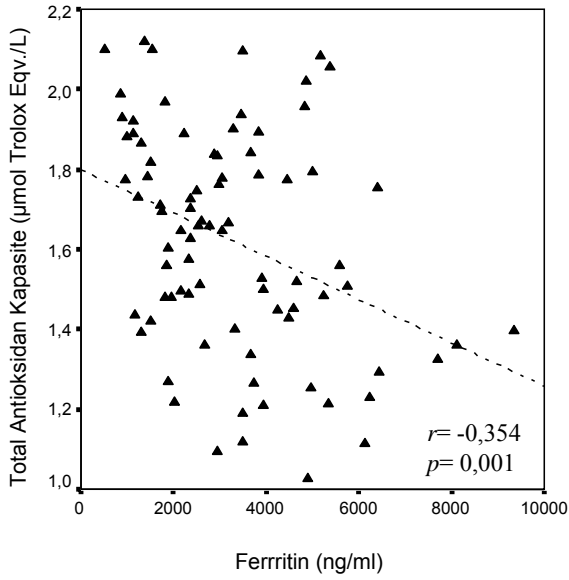
Şekil 13: β -TM'li olgularımızın serum demir düzeyi ile transfüzyon süresi arasındaki korelasyon grafiği.



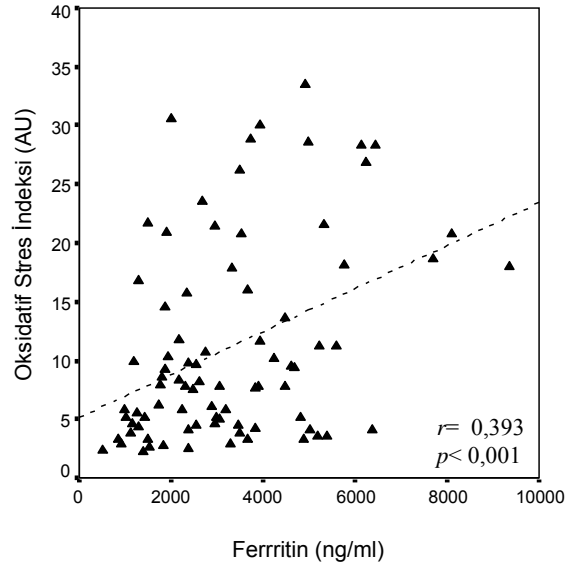
Şekil 14: β -TM'li olgularımızın serum ferritin düzeyi ile DNA hasarı arasındaki korelasyon grafiği.



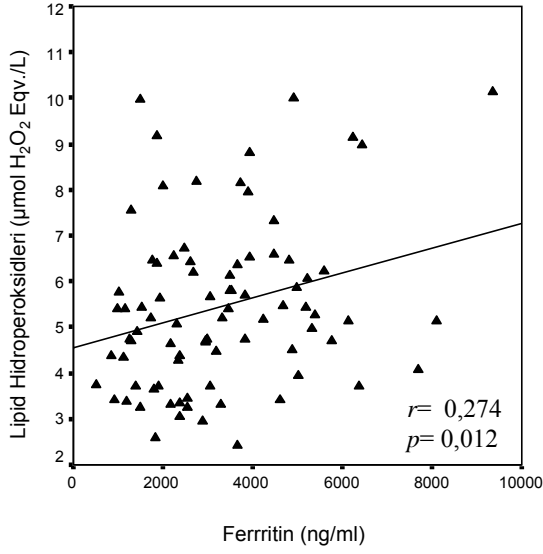
Şekil 15: β -TM'li olgularımızın serum ferritin düzeyi ile TOS arasındaki korelasyon grafiği.



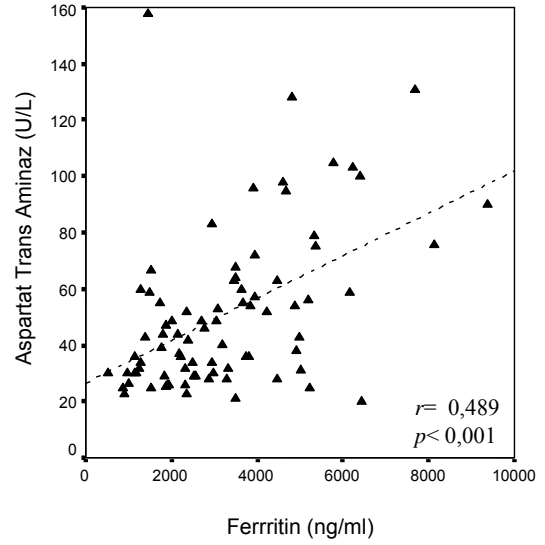
Şekil 16: β -TM'li olgularımızın serum ferritin düzeyi ile TAK arasındaki korelasyon grafiği.



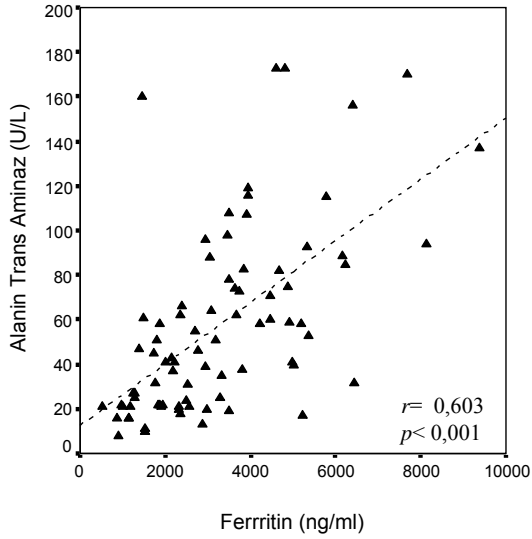
Şekil 17: β -TM'li olgularımızın serum ferritin düzeyi ile OSİ arasındaki korelasyon grafiği.



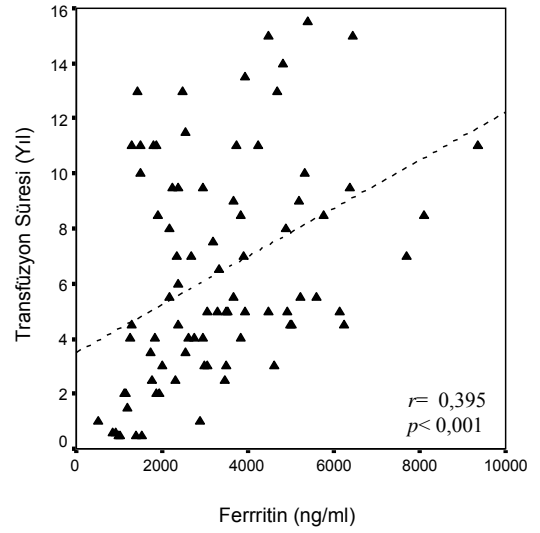
Şekil 18: β -TM'lü olgularımızın serum ferritin düzeyi ile LOOH arasındaki korelasyon grafiği.



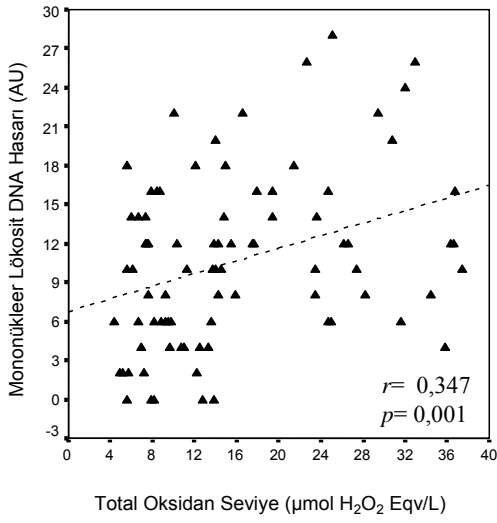
Şekil 19: β -TM'lü olgularımızın serum ferritin düzeyi ile AST arasındaki korelasyon grafiği.



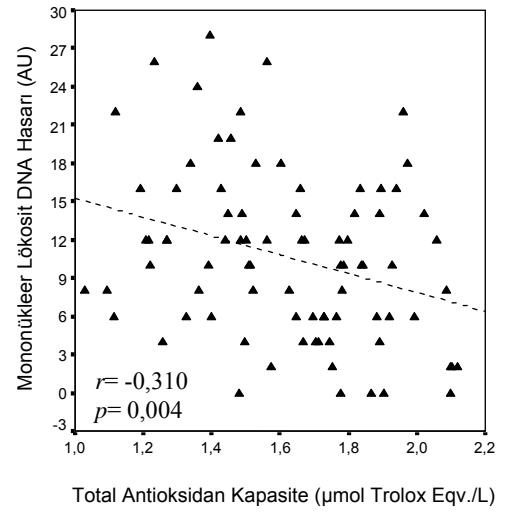
Şekil 20: β -TM'lü olgularımızın serum ferritin düzeyi ile ALT arasındaki korelasyon grafiği.



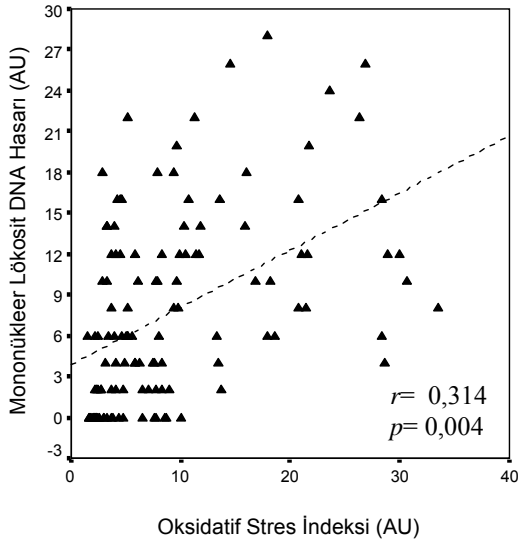
Şekil 21: β -TM'lü olgularımızın ferritin düzeyi ile transfüzyon süresi arasındaki korelasyon grafiği.



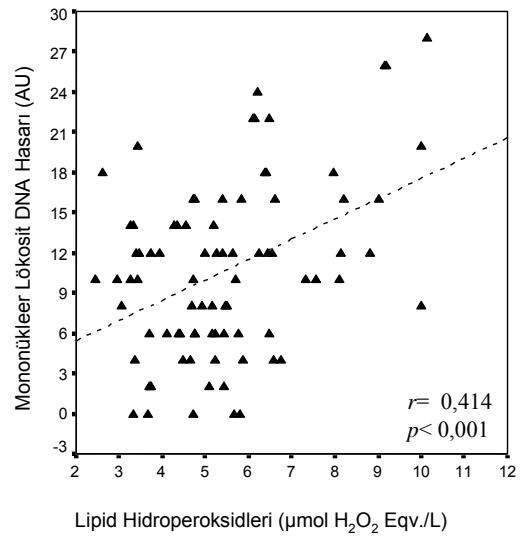
Şekil 22: β -TM'lü olgularımızın DNA hasarı ile TOS arasındaki korelasyon grafiği.



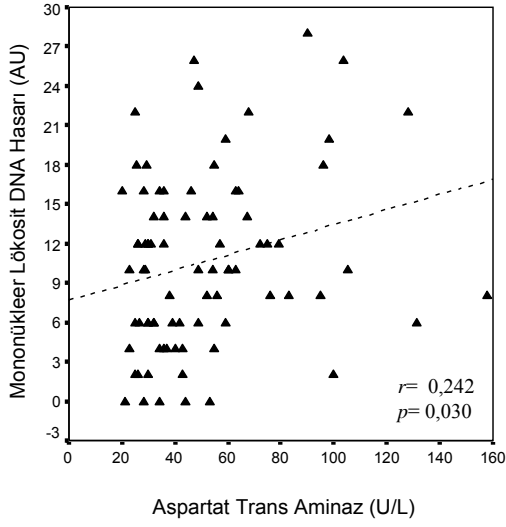
Şekil 23: β -TM'lü olgularımızın DNA hasarı ile TAK arasındaki korelasyon grafiği.



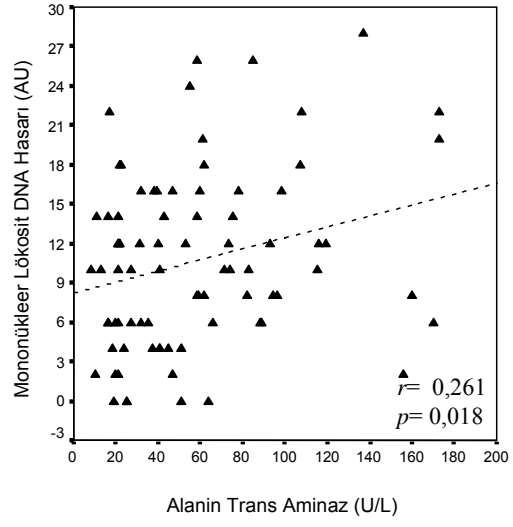
Şekil 24: β -TM'lü olgularımızın DNA hasarı ile OSİ arasındaki korelasyon grafiği.



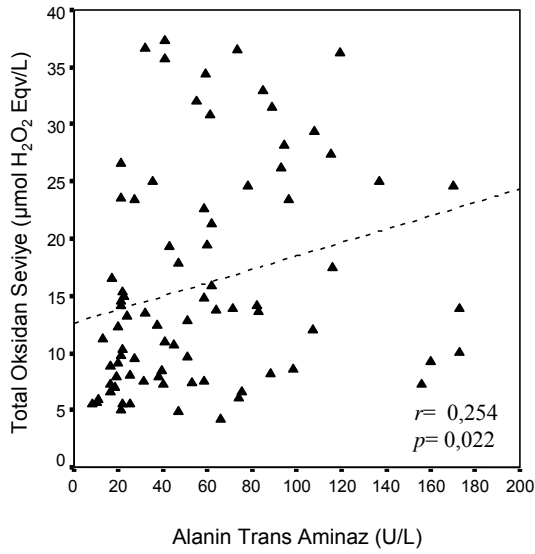
Şekil 25: β -TM'lü olgularımızın DNA hasarı ile LOOH arasındaki korelasyon grafiği.



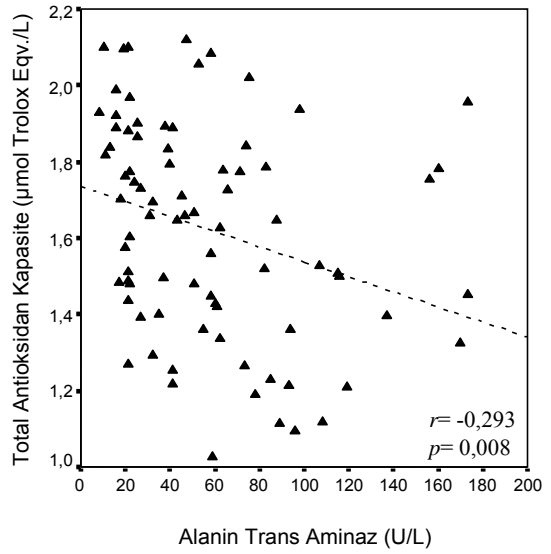
Şekil 26: β -TM'li olgularımızın DNA hasarı ile AST arasındaki korelasyon grafiği.



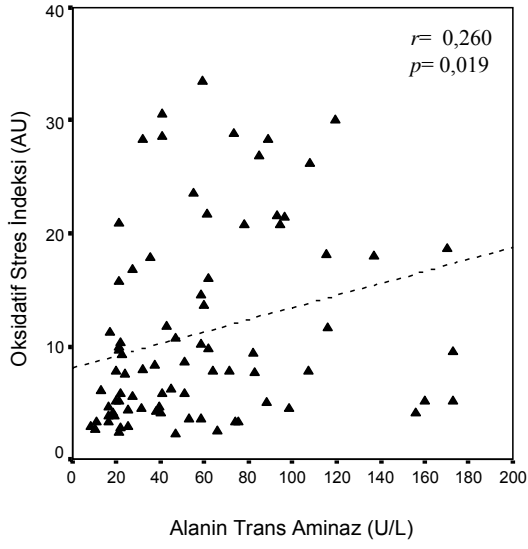
Şekil 27: β -TM'li olgularımızın DNA hasarı ile ALT arasındaki korelasyon grafiği.



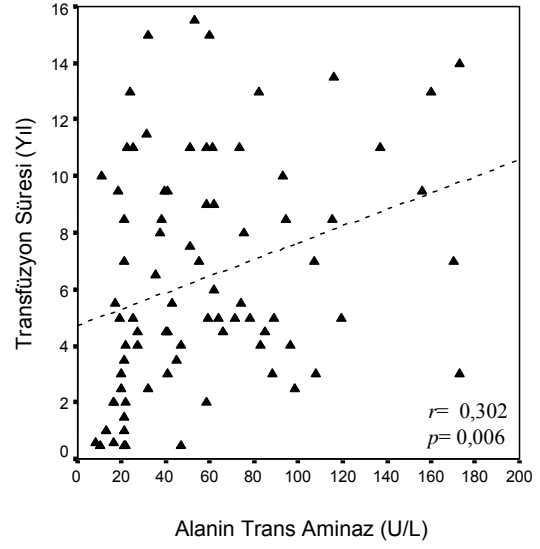
Şekil 28: β -TM'li olgularımızın TOS ile ALT arasındaki korelasyon grafiği.



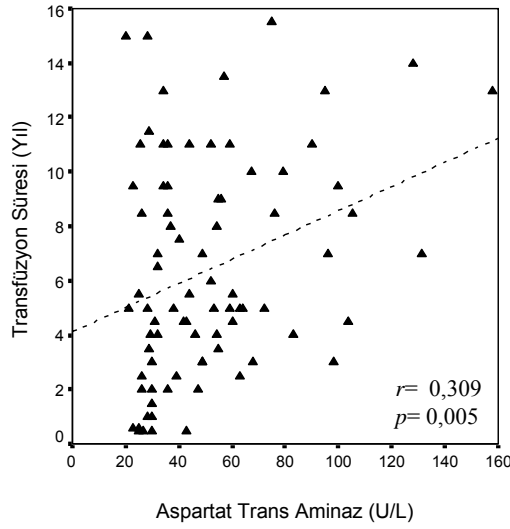
Şekil 29: β -TM'li olgularımızın TAK ile ALT arasındaki korelasyon grafiği.



Şekil 30: β -TM'lü olgularımızın OSI ile ALT arasındaki korelasyon grafiği.



Şekil 31: β -TM'lü olgularımızın transfüzyon süresi ile ALT arasındaki korelasyon grafiği.



Şekil 32: β -TM'lü olgularımızın transfüzyon süresi ile AST arasındaki korelasyon grafiği.

5-TARTIŞMA

Günümüzde uygun kan transfüzyonu uygulamalarıyla, talasemi hastalarının yaşam sürelerinde artışla beraber, demir bağımlı organ toksisitesi ve oksidatif hasar prognostik faktörler arasında önemle yer almaya devam etmektedir.

Bu çalışmada transfüzyon bağımlı β -TM'lü hastalarda oksidan / antioksidan sistem (Erel metodu ile) ve olası DNA hasarı (comet assay yöntemi ile) incelendi. Saptanan değişikliklerin demir yükü ile ilişkisi araştırıldı. Çalışmamız sonucunda β -TM'lü hastalarda oksidatif stres indeksinin arttığı ve belirgin DNA hasarının olduğu gözlemlendi.

β -TM tanısı ile takibimizde olan 83 hastamız, 68 ebeveynden (11 ebeveyn ikişer çocuk, iki ebeveyn 3 çocuk) gelmekteydi. Hastalarımızın 48'si (%57,8) Şanlıurfa/Merkez'den, diğerleri Şanlıurfa'nın ilçelerinden gelmekteydi. Bu sonuçlar hastalarımızın Şanlıurfa ve ilçelerinden geldiğini ve halen bilinçlendirmenin yeterli olmadığı, ailede talasemili çocuk olduğu halde yine talasemili kardeşlerin doğduğunu göstermekteydi.

Hastalarımızın yaş ortalamaları $7,34 \pm 4,21$ yıl, ortalama transfüzyon alma süresi $6,35 \pm 3,98$ yıl, eritrosit transfüzyonu öncesi ortalama Hb değerleri $8,11 \pm 1,47$ g/dl idi. β -TM'lü olgularımızın 17'si (%20,5) splenektomiliydi. Naithani ve ark.ları yaş ortalaması 9,5 yıl olan 50 β -TM'lü hastalarını sundukları çalışmada, transfüzyon öncesi ortalama Hb değerini $8,64 \pm 1,6$ g/dl olarak belirtmişler ve bu olguların sadece 4'üne (%8) splenektomi yapıldığını ifade etmişlerdir (119). β -TM'lü hastalarda artmış transfüzyon gereksinimleri ile beraber genelde 10 yaşından itibaren hipersplenizme rastlanmakta ve 200-250 ml/kg/yıl eritrosit transfüzyonu tüketimine ulaşıncaya transfüzyonları azaltmak için splenektomiye gidilmektedir. Modern geliştirilmiş transfüzyon uygulamaları hipersplenizm ve beraberinde splenektomiye azaltmıştır (120). Literatürde transfüzyona bağlı demir yüklenmesinin belirgin depo yeri olarak dalak görünmemekte ve splenektominin diğer organlarda demir yükünü arttıracığının kesin kanıtlanmadığı ifade edilmektedir (120, 121). Bizim çalışmamızda transfüzyon öncesi Hb değerimiz Naithani ve ark.larının çalışmasına benzer bulunmuştur. Splenektomiye giden vaka sayımız ise daha fazladır. Splenektomi oranımızın yüksekliği hastalarımızın düzenli transfüzyon programına uymadıklarını veya uygun transfüzyon alamadıklarını düşündürmekteydi.

β -TM'lü hastalarda aneminin fizyopatolojisinde ineffectif eritropoez ve hemoliz kombinasyonu yer alır (2,122). β -TM'lü hastalarda eritrosit hemolizinin etyopatogenezinde oksidatif stresin major faktör olarak rol aldığı giderek kabul edilmektedir (123). β -TM'lü hastaların eritrositlerinde superoksid iyon üretiminin normal eritrositlere göre 8 kat daha fazla olduğu ifade edilmiştir (86). Aynı zamanda oksidan hasarın eritroid progenitorlerde apoptozisi arttırarak ineffectif eritropoezisi arttırdığı ifade edilmiştir (124). Oksijen molekülünün ardışık ve eksik indirgenmesi ile oluşan serbest oksijen radikallerinin aşırı yapımı, antioksidan savunma sisteminde yetersizlik veya prooksidan-antioksidan sistemdeki uzamış dengesizlik oksidatif stresle sonuçlanır. Sonuçta oksidatif stres; hücre membran fonksiyonu, metabolizma ve gen ekspresyonu gibi hücrel aktivitelere önemli rol alan tüm biyokimyasal yapılarda (nükleik asit, protein, serbest aminoasit, lipid, karbonhidrat ve bağ doku makromolekülleri gibi) geri dönüşümlü veya dönüşümsüz hasara neden olabilir (119). Alkoksil, peroksil radikalleri ve aldehidler (özellikle MDA) oksidan etki oluştururken; suda ve yağda eriyebilen antioksidanlar ile antioksidan enzimler (SOD gibi) antioksidan kapasiteyi oluştururlar (122).

Talasemi hastalarında demir yüklenmesi, globin zincirlerinin otooksidasyonu ve HbA düşüklüğü oksidatif hasarı artıran ana faktörlerdendir (125). Talasemik eritrositlerdeki morfolojik anormallikler, eritrositlerin eksojen peroksidan tehditlere karşı dayanıklılığını azaltır (123, 125,126). Düşük MCHC, talasemik eritrositlerin peroksidatif hasara duyarlılığını arttırır (127).

Talasemi hastalarında eritrosit seri öncülleri ve dolaşımdaki eritrositlerde yüksek dansiteli eşleşmemiş α -Hb zincirleri artmıştır. Eşleşmemiş α -Hb zincirlerinin artışı eritrositleri oksidasyon ve denatürasyona karşı dayanıksız kılar (86). Otooksidasyon artışı ile beraber superoksit oluşumuda artar. Lipid peroksidasyon artışı ve beraberinde MDA artışı gerçekleşir (86). Eşleşmemiş α -Hb zincirleri aynı zamanda membrana bağlı hem ve demir miktarında artışada neden olur (119). Serbest demir en güçlü pro-oksidan moleküllerden biridir. Demirin; oksidatif stres, toksik serbest radikal oluşumu, lipid peroksidasyonu ve endotel disfonksiyonu gibi pek çok süreçte aktif rol oynadığı bilinmektedir (128). Serbest demir, süperoksit ve hidrojen peroksitin serbest radikallere dönüşümünü katalizleyerek hücrel membranlar, proteinler ve DNA'ya zarar vermektedir (47,89,90). β -TM'lü hastaların serumlarında artmış düşük moleküler ağırlıklı demir ve intraselüler non-hb demir, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları ile toksik oksijen radikallerini oluşumunu sağlar, hemikromların artışına katkıda bulunur, antioksidan savunmayı etkileyebilir, ve sonuçta eritrosit hemolizini arttırabilir (10, 123). Yine talasemik hastalarda; KC, hipofiz,

pankreas, kalp gibi organ ve hücre membranlarında demir aşırı birikimi peroksidatif hasara katkıda bulunarak organ yetersizliği (konjestif kalp yetmezliği vb) ve ölüme kadar giden tabloya neden olabilir (10, 119).

β -TM'lü olgularımızda oksidan-antioksidan sistem değerlendirmesinde TOS, OSI ve LOOH düzeylerinin kontrol grubuna göre belirgin arttığı, TAK'ın ise azaldığı saptandı (Tablo 8, Şekil 3-6). Literatürü incelediğimizde; Pavlova ve ark.ları, yaşları 5-21 yıl arasında değişen 22 β -TM'lü hastada lipid peroksidasyon ürünlerinin belirgin arttığını, buna karşılık SOD enzimi ve total antioksidan aktivitenin ise belirgin azaldığını saptamışlardır (122). Pavlova ve ark.ları, sonuçta β -TM'lü hastalarda serbest radikaller ve lipid peroksidasyon ürünlerinin arttığını, antioksidan aktivitenin azaldığını ve bunun da oksidan stresi arttırdığını vurgulamışlardır (122). Pavlova ve ark.ları, β -TM'lü hastalarda oksidatif strese bağlı TAK'de ki azalmanın, antioksidan enzimlerin yapımı-aktivasyonunda veya antioksidanların organlardan salınımında yetersizlikten kaynaklandığını ifade etmişlerdir (122). Bu çalışmada sonuç olarak hastalara doğal veya sentetik antioksidan kullanımıyla beraber demir şelatör tedavilere ağırlık verilmesinin oksidatif stresi azaltacağı vurgulanmıştır (122). Nitekim Laksmiawati ve ark.ları, düzensiz şelasyon tedavisi alan transfüzyon bağımlı β -TM'lü olgularında antioksidan seviyede belirgin azalma saptamışlardır (100).

Cighetti ve ark.ları, 21 β -TM'lü hastada oksidan sistemi değerlendirmek amacıyla serum MDA düzeyini, antioksidan sistemi değerlendirmek amacıyla ise TRAP (total peroxy radical-trapping antioxidant parameter) düzeylerini ölçmüş ve kontrol grubuna göre serum MDA düzeylerinde artış, TRAP düzeylerinde ise farklılık saptamamışlardır (9). Kassab-Chekir ve ark.ları, yaşları $8\pm 3,4$ yıl arasında değişen 56 transfüzyon bağımlı β -TM'lü çocukta oksidan parametre olarak TBARS (thiobarbituric acid reactive substances), antioksidan olarak TRAP, SOD, GPx düzeylerine bakmışlardır (129). Araştırmacılar β -TM'lü hastalarda SOD, GPx ve TBARS konsantrasyonunda artış, Cighetti ve ark.larının çalışmalarından farklı olarak TRAP düzeyinde ise azalma saptamışlardır (129).

Livrea ve ark.ları, 42 β -TM'lü hastada Conjugated diene (CD) ve MDA düzeylerini artmış, TAK'nin ise azalmış olduğunu saptamışlardır (10). Ülkemizde yapılan bir çalışmada, Meral ve ark.ları, 22 β -TM'lü ve 19 demir eksikliği anemili olguda oksidatif parametre olarak CD ve TBARS, antioksidan parametre olarak ise SOD ve GPx'i değerlendirmişlerdir (98). β -

TM'lü olgularda demir eksikliği olgularına göre oksidan parametreler ve kompansatris olarak antioksidan parametrelerin artmış olduğunu saptamışlardır (98).

Naithani ve ark.ları, 50 β -TM'lü hastada oksidan sistem olarak MDA düzeyini, antioksidan olarak ise SOD, GPx ve NOx düzeylerini değerlendirmiş ve bu parametrelerin serum demiri, ferritin, KC enzimleri ile korelasyonunu araştırmışlardır (119). MDA, SOD ve NOx düzeylerini talasemik çocuklarda artmış olarak gözlemlemişken, GPx düzeylerini azalmış olarak saptamışlardır (119). Ülkemizde yapılan bir diğer çalışmada, Şimşek ve ark.ları, 11 β -TM'lü hastada MDA ve SOD düzeylerini kontrol grubuna göre yüksek bulmuşlardır (130).

Yukarıdaki çalışmalarda görüldüğü gibi β -TM'lü hastalarda oksidan seviyeyi belirlemek amacıyla ölçülen MDA düzeyi genelde kontrol grubundan yüksek bulunmuştur (9,10,127,130). Talasemili hastalarda lipid peroksidasyon ürünü olan MDA düzeylerindeki bu artış, serbest radikallerin eritrosit membranındaki labil PUFA ile etkileşime girerek eritrosit hemolizi ve harabiyetinde major rol aldığını desteklemektedir (10,119,127). Lipid peroksidasyonunda artış serbest oksijen radikalleri artışını destekler, primer doku hasarı ile ilişkili olmasa bile hasarın şiddetini artırabilir (119). β -TM'lü olgularımızda TOS ve LOOH düzeylerinin kontrol grubuna göre belirgin yüksek olarak saptanması bu görüşleri desteklemekte ve talasemili hastalarda oksidan seviyenin arttığını ifade etmektedir.

Vücudumuz, oksidatif hasarı önlemek amacıyla antioksidanlarla desteklenen endojen savunma mekanizmalarını devreye sokar. β -TM'lü hastalarda plazma veya eritrosit E vitamini düzeylerindeki yetersizlik ve SOD'un da içinde bulunduğu birkaç enzimin aktivitesindeki azalmanın antioksidan savunmada yetersizliğe yol açtığı belirtilmektedir (131-133).

SOD, substrat olarak serbest oksijen radikallerini kullanan ve süperoksiti hidrojen peroksida ve moleküler oksijene dismutasyonunu katalize eden bir enzimdir. Oluşan reaksiyon "oksidatif strese karşı ilk savunma" olarak da adlandırılmaktadır (125). Aynı zamanda SOD, lipid peroksidasyonunu da inhibe etmektedir (53). Yukarıdaki çalışmalarda görüldüğü gibi antioksidan sistemi değerlendirmek için daha çok SOD enzim düzeyi çalışılmıştır. Literatürde talasemik hastalarda SOD enzim düzeyi artmış (119,129,130) veya azalmış olarak (122, 125, 127) saptanmıştır. Artışının gözlemlendiği çalışmalarda, oksidatif stres ile savaşmada superoksid iyon yapımını mühafaza etmek amacı ile SOD enziminin arttığı ifade edilmiştir (119,130). Bununla birlikte SOD enzim düzeyindeki artış sonradan eritrositlerden peroksidazlar uzaklaştırılmadıkça hücrede H₂O₂ düzeyinde artışa neden olur (119). β -TM'lü olgularda SOD

enziminin azalması ise yapım, aktivasyon veya salınım ile ilgili yetersizlikten kaynaklanabileceği ifade edilmiştir (122).

β -TM'lü hastalarda diğer enzimatik ve non-enzimatik antioksidan savunma sistemleride araştırılmıştır. En kapsamlı çalışmalardan birisi Chakraborty ve ark.ları tarafından gerçekleştirilmiştir (134). Araştırmacılar, 45 β -TM'lü hastada antioksidan sistemi değerlendirmek amacıyla G6PD, GR, GPx, GST, SOD, CAT ve GSH'yı araştırmışlar; GSH düzeylerinde azalma, G6PD, GR, GPx ve SOD enzim düzeylerinde ise artış saptamışlardır (134). Bu çalışmada, önemli intrasellüler antioksidanlardan olan GSH'nın düzeylerindeki azalmanın oksidatif savunmada yetersizlikle beraber eritrosit ömründe azalma ve hemoliz artışına katkıda bulunduğu vurgulanmıştır (134).

Total antioksidan kapasitenin ölçümü, antioksidanların tek tek ölçümünden daha değerli bilgiler vermektedir. Bu yüzden kanın antioksidan durumunu saptamada, bireysel antioksidanlardan çok bunların toplam antioksidan değerini veren toplam antioksidan kapasite ölçümü yaygınlaşmaktadır (50,83). Çalışmamızda oksidan/antioksidan sistem toplam olarak, Erel metodu ile değerlendirildi (116,117). β -TM'lü hastalarda total oksidan seviyenin arttığı, oksidatif hasarı nötralize etmeye yönelik antioksidan defans mekanizmasının yani total antioksidan kapasitenin azaldığı saptandı. Literatürde SOD ve GPx gibi antioksidan enzim aktivitelerinin artışına rağmen serbest radikallerin hasarına karşılık verilemediği ve sonuçta oksidan seviyenin arttığı antioksidan kapasitenin ise azaldığı vurgulanmıştır (129). Bizim sonuçlarımız bu bulguları desteklemektedir.

Vücutta reaktif oksijen türlerinin düzeylerini kontrol altında tutmak ve oluşturabilecekleri hasarları engellemek için savunma mekanizmalarından biri de antioksidan vitaminlerdir. Cheng ve ark.ları A, C ve E vit'i düzeylerinin α -talasemi hastalarında belirgin azaldığını belirtmişlerdir (127). Serbest radikallerin membran fosfolipidleri üzerindeki etkisini sonlandırmada rol alan SOD gibi enzimleri destekleyen, doğal antioksidan, E vit'i talasemik hastalarda daha sıklıkla çalışılmıştır. E vit'inin talasemik hastalarda azaldığı ve E vit'ini suplementasyonu ile oksidatif rezistansın arttığı gösterilmiştir (10,125,129-135). Plazma E vit'i düzeylerinde saptanan düşüklükler artmış kullanıma bağlanmış, bu antioksidanın miktarının azalmasının eritrositlerde lipid peroksidasyonunun artışına ve sonuçta hemolize katkıda bulunacağı ifade edilmiştir (96,97,130). Livrea ve ark.ları, serum E vit'ini düzeyi ile serum ferritini arasında negatif korelasyon saptamışlardır (10). Dhawan ve ark.ları, 41 transfüzyon bağımlı talasemi hastasında

plazma A ve E vit'i düzeyini düşük bulmuşlardır (125). Dhawan ve ark.ları , SOD enzim aktivitesi ile Hb konsantrasyonu ve eritrosit E vit'i düzeyi arasında negatif korelasyon saptamışlardır (125). 12 ay boyunca terapötik E vit'i alan hastalarda eritrosit yaşam ömründe belirgin uzama ve MDA düzeylerinde azalma saptanmıştır (135). E vit'i uygulamasının; transfüzyon intervallerini uzattığı ve transfüzyon öncesi Hb miktarını arttırdığına ait yayınlara karşın (133), eritrosit E vit'i düzeyinin 3-6 kez artırmasına rağmen transfüzyon gereksiniminde değişiklik oluşturmadığını belirten yayınlar da mevcuttur (136). Ayrıca yüksek doz E vit'i uygulamasının hemoliz ve oksidatif stresi önleyemediği literatürde vurgulanmıştır (125). Bu farklı görüşler E vit'inin eritrositi hemolize karşı koruyacak tek antioksidan faktör olmadığını desteklemektedir (125). E vit'i sadece membran lipidlerinin peroksidasyonunu önlemekte, oksijen radikallerinin diğer hücre komponentleri üzerine olan etkisini önleyememektedir. Bizim olgularımızın hiçbiri E vit'i almıyordu. β -TM'lü hastalarda demir bağımlı KC hasarının yağda eriyen antioksidanların seviyelerinde azalmaya katkıda bulunduğu ifade edilmiştir (10). Yine β -TM'lü hastaların yetersiz şelasyon tedavisi almasının antioksidanları azaltabileceği vurgulanmıştır (100). Bu özelliklerin olgularımızda total antioksidan kapasitenin oldukça düşük saptanmasına katkıda bulunduğu düşüncesindeyiz. Olgularımızda saptanan LOOH düzeylerindeki artış ve TAK düzeylerindeki azalma; antioksidan dengeyi oluşturmada ve oksidatif hasarı azaltmada β -TM'lü hastalara E vit'i gibi antioksidanların uygulanmasının (diyet veya tedavi yoluyla) faydalı olabileceği düşüncesini doğurmaktaydı.

Talasemik hastalarda, tekrarlanan kan transfüzyonları ile ağır demir yüklenmesi ve beraberinde transferine bağlı olmayan düşük molekül ağırlıklı demir fraksiyonunda artış, serbest oksijen radikalleri oluşumunda önemlidir (9). Cighetti ve ark.ları, 21 β -TM'lü hastada serum NTBI düzeyi ile serum MDA düzeyi arasında pozitif korelasyon, serum NTBI düzeyi ile TRAP arasında ise negatif korelasyon saptamışlardır (9). Bu çalışmalarını destekler şekilde, β -TM'lü olgularımızda serum demir düzeyi ile, TOS ve OSİ arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon; TAK ile istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon saptandı (Tablo 9, Şekil 8-10).

Livrea ve ark.ları, ortalama ferritin düzeyi 1866 ± 996 ng/ml olan 42 β -TM'lü olguda serum ferritin düzeyi ile MDA arasında pozitif korelasyon saptamışlardır (10). Benzer bir çalışmada, Naithani ve ark.ları, 50 β -TM'lü olguda serum ferritin düzeyini 3709 ± 1625 ng/ml olarak saptamışlar ve serum ferritin düzeyi ile GPx düzeyi arasında negatif diğer oksidan stres oluşturan parametreler ile arasında ise pozitif korelasyon gözlemişlerdir (119). Serum ferritin

düzeşini 3271,15±1809,63 ng/ml olarak saptadığımız β-TM'lü olgularımızda, serum ferritin düzeyi ile sırasıyla TOS, OSİ ve LOOH arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon; TAK ile istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon saptandı (Tablo 9, Şekil 15-18). Literatür bilgileri ve bulgularımız, β-TM'lü hastalarda serbest radikal üretimi ve sonuçta oluşan peroksidatif doku hasarıyla oksidatif stres indeksinin artışında demir yüklenmesinin önemli rolü olduğunu göstermektedir.

β-TM'lü hastalarda yaşamı tehdit eden faktörlerden en önemlisi özellikle kan transfüzyonlarına bağlı olarak gelişen demir yüküdür (98). Demir yükünün doğru, güvenilir ve kolay ulaşılabilir bir yöntemle ve tüm dokular hakkında bilgi verecek şekilde ölçümü, β-TM'lü hastalarda demir yükünün tanısı ve tedavisinde önemlidir. Ferritin, primer olarak demiri depolayan hücre içi bir moleküldür. Dolaşımdaki ferritin, total vücut demirinin çok küçük bir kısmıdır. Plazma veya serum ferritin konsantrasyonu vücut demir yükünü indirek değerlendirmede en sık kullanılan non-invazif biyokimyasal belirteçtir. Ama ferritinin hasarlı hücrelerden salınımı vücut demir yükünü göstermede etkinliğini azaltabilir (120, 137). Aynı zamanda vücut demir yükünden bağmsız olarak; askorbat eksikliği, akut ve kronik enfeksiyon, inflamasyon ve hepatik hastalık gibi durumlarda da serum ferritin düzeyinde değişiklikler olabilmektedir (120, 138). Bundan dolayı β-TM'de, serum ferritininde ki değişikliklerin yalnızca %57 oranında vücut demir miktarı ile ilişkilendirilebileceği ifade edilmiştir (120,139). Buna karşın β-TM'lü hastalarda vücut demir yükünü ölçmede hepatik demir konsantrasyonunu değerlendirmek spesifik ve sensitif bir metod olarak kabul edilmektedir (140). Bu amaçla invazif KC biyopsisi veya radyolojik görüntüleme yöntemleri (MRI gibi) kullanılabilir. Karaciğer biyopsisinin ağrı verici, enfeksiyon ve kanamaya yol açabilen invazif bir yöntem olması kullanılabilirliğini azaltmaktadır. Son zamanlarda doku demirini saptamada sınırlı sayıda merkezde uygulanabilen T2 MRI (kardiak demir yoğunluğu için), R2MRI (hepatik demir yoğunluğu için) ve superconducting susceptometry (SQUID) gibi özel bazı radyolojik teknikler kullanılmaya başlanmıştır (120, 141,142). Sonuçta serum ferritini total vücut demir yükünü göstermede kesin olmayan bir markır olarak kabul edilse de; bizim, Naithani ve Livrea ark.larının bulguları MRI ve SQUİD gibi uygulamaların yaygın olarak kullanılmadığı merkezlerde serum ferritininin pratik ve son derece elverişli bir metod olarak halen kullanılabilirliğini desteklemektedir (10,119).

β -TM'lü hastalarda makrofajların demire doymasından sonra demir KC, kalp, pankreas, hipofiz bezi ve paratiroid bezleri gibi parankimal dokuların hücrelerinde birikmeye ve biriken organda fonksiyon bozukluklarına yol açar. Talasemide demirin %90'dan fazlası KC fagositik ve parankimal hücrelerinde, %1 kadarı ise kalpte birikir (26). KC, lizozom ve mitokondrilerinde membran bağımlı fonksiyonlarda, lipid peroksidasyonuna bağlı bozulma meydana gelebilir. Aynı zamanda demir yüklenmesi sitokrom C oksidaz aktivitesini azaltarak hepatik mitokondrial fonksiyonu bozabilir (109). Dolayısıyla KC hastalığı β -TM'lü hastaların büyük bir kısmını etkiler. Demir depolanması dışında kan transfüzyonları sonucu bulaşan enfeksiyonlar ve kullanılan ilaçlarda KC sorunlarına neden olabilir. ALT, karaciğer hücre hasarının değerlendirilmesinde en çok kullanılan, en yararlı testtir. Kassab-Chekir ve ark.ları, β -TM'lü hastalarında kontrol grubuna göre serum transaminazlarında 2 kat artış saptamışlardır (129). Perifanis ve ark.ları, β -TM'lü hastalarının %53,9'unda ALT yüksekliği saptamışlar ve ALT ile ferritin düzeyi arasında pozitif korelasyon gözlemlemişlerdir (143). Yine Naithani ve ark.ları, serum ferritin düzeyi ile AST ve ALT arasında pozitif korelasyon saptamışlardır (119). Literatür ile uyumlu olarak çalışmamızda KC enzimlerinden AST ve ALT düzeylerini kontrol grubuna göre belirgin yüksek bulduk (Tablo 6). β -TM'lü hastalarda, oluşan enzim yüksekliklerinin hepatik nekroinflamasyon ve sitolizis sendromunun bulgusu olduğu ifade edilmiştir (129).

β -TM'lü hastalarımızda; TG düzeylerinde artış, Total Kolesterol, HDL-Kol ve LDL-Kol düzeylerinde ise azalma saptandı (Tablo 6). Benzer bir çalışmada Kassab-Chekir ve ark.ları, β -TM'lü olgularında Kolesterol, HDL-Kol ve LDL-Kol düzeylerinde azalma, TG düzeylerinde ise değişiklik saptamamışlardır (144). Bu çalışmada β -TM'lü hastalarda; yaş, transfüzyon ihtiyaçları ve splenektomiden bağımsız, anormal yapı ve bileşimde lipoproteinler olduğu ifade edilmiştir (144). Yine Al-Quobaili ve ark.ları 30 β -TM'lü, Papanastasiou ve ark.ları 104 β -talasemili çocukta, Canatan ve ark.ları 80 β -TM'lü hastada kontrol grubuna göre Total Kolesterol, HDL-Kol ve LDL-Kol düzeylerinde azalma, TG düzeylerinde ise artış saptamışlardır (145-147). Talasemik hastalarda hepatik bozukluğun, serumda fosfolipid, kolesterol ve PUFA'nın azalmasına katkıda bulunduğu ve beraberinde lipid solubl antioksidanların azalmasının demir bağımlı karaciğer harabiyetini artırabileceği ifade edilmiştir (10). Literatür ile benzer olarak β -TM'lü hastalarda saptadığımız lipid değişiklikleri hastalarda hepatik hasar ve nekroinflamasyon olduğunu desteklemektedir.

Walter ve ark.ları, serum ALT düzeyinin β -TM'lü hastalarında kontrol grubuna göre belirgin arttığı ve serum ALT düzeyinin KC demir konsantrasyonu ile pozitif korelasyon gösterdiğini saptamışlardır (148). Yine aynı araştırmacı hayvan modellerinde KC demir konsantrasyonu artışının Fenton Kimyası yoluyla oksidan hasara neden olduğunu belirtmiştir (149). Walter ve ark.ları, plazma MDA düzeyinin β -TM'lü hastalarda belirgin arttığını ve KC demir konsantrasyonu ile pozitif korelasyon gösterdiğini saptamışlardır. β -TM'lü olgularımızda serum demir ve ferritin düzeyleri ile AST, ALT ve transfüzyon yılı arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptandı (Tablo 9, Şekil 11-13, Şekil 19-21). Aynı zamanda β -TM'lü olgularımızda TOS ve OSİ ile ALT arasında pozitif korelasyon, TAK ile ALT arasında ise negatif korelasyon saptandı (Tablo 9, Şekil 28-30). Bu bulgularımız Walter ve ark.larının sonuçlarını desteklemekte ve hastalarımızda demir yüklenmesi ve beraberinde KC harabiyetinin oksidatif ürünlerin plazmada artışına katkıda bulunduğunu ifade etmektedir. β -TM'lü olgularımızda serum AST ve ALT düzeyleri ile transfüzyon yılı arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptandı (Tablo 9, Şekil 31,32). Bulunan sonuçlar ışığında; transfüzyon yılının artışı ile beraber sekonder demir yükünün gerçekleştiği, beraberinde oksidatif strese bağlı peroksidatif doku hasarının oluşumuyla KC enzim düzeylerindeki artış, KC harabiyeti ve oksidatif stresin güçlendiği düşünüldü.

DNA çok sayıda negatif yüklü fosfat grupları içeren ve çeşitli kationları bağlama yeteneğine sahip büyük bir anyondur. $Fe^{2+/3+}$ ve $Cu^{1+/2+}$ iyonları; negatif yüklü DNA'ya sürekli bağlı oldukları gibi oksidatif stres altında hücre içinde bulunan proteinlerden serbestleşerek de DNA'ya bağlanabilmektedirler. Metal iyonlarının bağlanmaları DNA molekülünü H_2O_2 'in hedefi haline getirmektedir (50,71). Doğrudan DNA'da hasar yapamayan H_2O_2 , membranı kolayca geçerek, nükleusta Fe-Cu iyonları ile reaksiyonlaşarak OH radikallerini oluşturur ve DNA'da hasara neden olabilir. DNA hasarı ve demir yükü çeşitli çalışmalarda ilişkilendirilmiştir. Demir tuzlarının in vitro olarak, rat karaciğerinin nükleus veya mitokondrisinden izole edilen DNA'da tek sarmal kırıklara neden olduğu gösterilmiştir (101,102). Memeli hücrelerinde yapılan deneysel çalışmalarda hidrojen peroksitide bağlı DNA hasarında demirin anahtar rol oynadığı ve bu hasarın demir şelatör tedaviler ile azaltılabileceği belirtilmiştir (103-105). Kronik demir yüklenmesinin sonucu olarak ratlarda hepatik DNA'da fragmantasyon ve "strand break"lerde artış gösterilmiştir (109, 149). DNA'da "strand break" lerin oluşumu kimyasal karsinogenezisin hem başlama hemde ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir (109,150,151). Farelere diyetle karbonil demir veya subkutan

demir dekstran enjeksiyonu ile artmış oksidatif stresle beraber hepatik DNA hasarı oluşturulmuş ve oluşan DNA hasarı 8-hidroksideoksiguanozin artışı ile desteklenmiştir (109,152,153). Ayrıca demir, DNA hasarı yanında hücrelerde transformasyonlara da neden olabilir. Ratlara, FeNTA'nın tekrarlanan intraperitoneal uygulaması ile renal DNA'da 8-hidroksideoksiguanozin'de artış; renal adenokarsinoma, karaciğer, akciğer ve periton metaztazi gözlenmiştir.(109, 154,155). İlginç olan bir bulgu ise E vit'i suplementasyonu ile FeNTA'ya bağlı renal lipid peroksidasyonunun, apoptozis, 8- hidroksideoksiguanozin yapımının inhibe edildiği ve sonuçta kanser gelişiminin azaldığı gösterilmiştir (156). Ayrıca yüksek konsantrasyonda FeNTA ile fare karaciğeri epitel hücrelerinin kültür ortamında karşılaştırılması sonucunda hücrelerde morfolojik değişimler gözlenmiş ve bu hücrelerin ratlara enjeksiyonu ile metastatik karsinoma oluşturulmuştur (157).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda olası DNA hasarı, demir yüklenmesi gelişmiş hastalarda araştırılmak istenmiştir. Herediter hemikromatozlu (HH) hastalarda uzun süreli demir birikiminin, demir bağımlı oksidatif hasara bağlı olarak hepatik DNA'yı etkilemesi ve hepatosellüler karsinoma gelişme riskini arttırdığı ifade edilmiştir (107-109). Carmichael ve ark.ları, 6 HH'li hastanın hepatik DNA örneklerini incelemiş ve her 100 milyon nukleotidde 2-50 baz modifikasyonu içeren "bulky" DNA lezyonları saptamışlardır (158). DNA hasarı, kanserin tek nedeni olmasa bile etyolojisinde artık sayılmaktadır (12). Sonuçta hayvan deneyleri ve HH'li hastalarda artmış demirin DNA hasarına oluşumuna katkıda bulunacağı ve bu hasarın karsinogenez oluşumunda önemli bir adım olabileceği ifade edilmiştir (109).

Offer ve ark.ları, demir bağımlı oksidatif stresin patofizyolojide önemli rol aldığı β -TM'lü hastalarda olası DNA hasarını incelemek istemişler ve bu amaçla mikronukleus testi ile kromozom kırıklarının değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar bu çalışma sonucunda β -TM'lü hastalarda kırık oranında artış saptamışlardır (12). Offer ve ark.ları, oksidatif stresin kromozom kırıklarına neden olabileceğini bu çalışma ile desteklemişlerdir (12).

Olası DNA hasarını araştırmak istediğimiz β -TM'lü hastalarımızda, alkali comet assay yöntemini kullandık. Comet assay; hızlı, basit ve hücresel düzeyde uygulanması kolay, olası endojen DNA hasarını iyi tanımlayan bir tekniktir (110-115). Hasta grubumuzda DNA hasarı: $10,65 \pm 6,58$ AU, kontrol grubumuzda ise DNA hasarı: $1,45 \pm 2,02$ AU, olarak saptandı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında β -TM'lü hastalarımızda DNA hasarının yaklaşık 6-7 kat artmış olduğu saptandı (Tablo 8, Şekil 2). Yine β -TM'lü olgularımızda serum demir ve ferritin düzeyi ile DNA hasarı arasında pozitif korelasyon saptandı (Tablo 9, Şekil 7, Şekil 14). Aynı

zamanda β -TM'lü olgularımızda DNA hasarı ile sırasıyla TOS, OSİ, LOOH, AST ve ALT arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon, TAK ile istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon saptandı (Tablo 9, Şekil 22-27). β -TM'lü olgularda DNA hasarı oluşumunda demir yükünün önemli rol aldığı çalışmamız sonucunda gösterilmiştir. Dolayısıyla deneysel ve HH'li hastalarda demir yükü ve DNA hasarı ilişkisini araştıran literatür bilgileri desteklenmiştir. Literatüre ek olarak, saptanan DNA hasarının demir yükü ile beraber oksidatif stres ve KC etkilenmesi ile ilişkisi gösterilmiştir. β -TM'lü olgularda DNA hasarı karsinogenezise yol açan önemli bir adım olabilir. Beraberinde bir proliferatif stimulus bu hasarı daha belirgin hale getirebilir. β -TM'lü hastalarda oksidatif stres ile beraber karaciğer etkilenmesinin DNA hasarı ve karsinogenezis oluşumunda proliferatif stimulus rolü üstlendiği düşüncesindeyiz. Demir yükü ve oksidan seviyeyi azaltmak buna karşın antioksidan kapasiteyi arttırmak DNA hasarını azaltabilir.

6-SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Çalışmamız sonucunda β -TM'lü hastalarda total oksidan seviyenin arttığı, total antioksidan kapasitenin azaldığı ve dolayısıyla oksidatif stres indeksinin, oksidatif hasarın belirgin düzeyde arttığı saptanmıştır.
2. Çalışmamız sonucunda β -TM'lü hastalarda artmış DNA hasarı saptanmıştır. β -TM'lü olgularımızda artmış DNA hasarıyla; total oksidan seviye, oksidatif stres indeksi, lipid hidroperoksid arasında yakın pozitif ilişki, total antioksidan kapasite ile DNA hasarı arasında ise negatif ilişki saptanmıştır.
3. Hastaların demir yükü ile oksidatif stres ve DNA hasarı arasında belirgin pozitif korelasyon bulunmuştur.
4. β -TM'lü olgularımızda transfüzyon yılı artışının, demir yükü ve beraberinde karaciğer enzimlerinde artışa neden olduğu saptanmıştır.

β -TM'lü hastalarda serbest radikal ve demir yükünü azaltmak, oksidatif stresi ve DNA hasarını azaltacaktır. Bu amaçla; düzenli demir şelatör tedaviler kullanımıyla demir yükünün azaltılması, oksidan stresi ve DNA hasarını azaltabilir. Yine β -TM'lü hastalara doğal veya sentetik antioksidanların kullanımı önerilerek antioksidan kapasite arttırılabilir.

Bu sonuçlar ve bilgiler ışığında; ileriki yıllarda, β -TM'lü hastalarda antioksidanların oksidatif stres ve DNA hasarı üzerindeki etkisinin araştırılmasına yönelik çalışmalar ile demir yükünün azaltılması amacına yönelik çalışmaların daha fazla önem kazanacağı düşüncesindeyiz.

7- KAYNAKLAR

1. Orkin SH, Nathan DG. The Thalassemias. In: Nathan DG, Orkin SH (eds), Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood, 5th ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1998; 811-886.
2. Lanzkowsky P. Hemolytic anemia. In: Lanzkowsky P (ed), Manual of Pediatric Hematology and Oncology. 4th ed. California: Elsevier Academic Press, 2005; 136-198.
3. Lukens JN. Abnormal hemoglobins: General Principles. In: Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B (eds). Wintrobe's Clinical Hematology, 11th ed, Vol 1, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004; 1247-1262.
4. Gümruk F, Altay Ç. Talasemiler. Katkı Pediatri Dergisi 1995; 3:307-326.
5. Aydınok Y. Beta Talasemi. Eritrosit Hastalıkları. Tanı ve Tedavi El Kitabı 2007, s: 41-46.
6. Kutlu M, Çekmiş H, Başak M, Osman N, Açıkgöz Ö, Sevindir İ, Özcan ZÖ. Talasemiler. Bakırköy Tıp Dergisi 2006; 2: 33-40.
7. Şimşek F. Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve lipid peroksidasyonu. Türkiye Klinikleri J Pediatr 1999; 8:42-47.
8. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi 1997; 3-4:92-95.
9. Cighetti G, Duca L, Bortone L, Sala S, Nava I, Fiorelli G, Cappellini MD. Oxidative status and malondialdehyde in B-thalassaemia patients. European Journal of Clinical Investigation 2002; 32: 55-60.
10. Livrea MA, Tesoriere L, Pintaudi AM, Calabrese A, Maggio A, Freisleben HJ, D'Arpa D, D'Anna R, Bongiorno A. Oxidative stress and antioxidant status in beta-thalassemia major: iron overload and depletion of lipid-soluble antioxidants. Blood 1996;88: 3608-14.
11. http://www.medicine.ankara.edu.tr/internal_medical/pediatrics/molgen/index.php?PgId=77.
12. Offer T, Bhagat A, Lal A, Atamna W, Singer ST, Vichinsky EP, Kuypers FA, Ames BN. Measuring chromosome breaks in patients with thalassemia. Ann NY Acad Sci 2005; 1054: 439-44.
13. Kern WF. PDQ Hematoloji. Ferhanoğlu F (Çev). Kalıtsal Hemolitik Anemiler: Hemoglobinopatiler, Talasemiler, Enzim Eksiklikleri ve Membran Bozuklukları. İstanbul Medikal Yayıncılık, 2005, s:77-113.

14. Apak H. Hemoglobinopatiler ve Talasemiler. İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Anemiler Sempozyumu, 19-20 Nisan 2001, İstanbul,s:149-162.
15. Cooley TB, Lee P. Series of cases of splenomegaly in children with anemia and peculiar bone changes. *Trans Am Pediatr Soc* 1925; 37-29.
16. Cooley TB, Witwer ER et al. Anemia in children with splenomegaly and peculiar changes in the bones. Report of cases. *Am J Dis Child* 1927; 34:347.
17. Borgna-Pignatti C, Galanello R. Thalassemias and Related Disorders: Quantitative Disorders of Hemoglobin Synthesis. In: Greer JP, Foerster J, Lukens JN Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B. (eds). *Wintrobe's Clinical Hematology*, eleventh ed, Vol 1, Philadelphia: Lippincott Williams& Wilkins, 2004; 1319-1365.
18. Aksoy M. Türkiye'de Talaseminin tarihçesine kısa bir bakış. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 1991; 34:1-8.
19. Günçağ D, Pekçelen Y, Atamer T. Talasemi. In: Günçağ D (Editör) *Klinik Hematoloji*, İstanbul; Nobel Matbaacılık, 2003; 137-147.
20. Altay Ç. The Frequency and Distribution Pattern of β -Thalassemia Mutations in Turkey. *Turkish Journal Haematol* 2002; 19: 309-315.
21. Tadmouri GO, Tüzmen Ş, Özçelik H, Özer A. Molecular and population genetic analyses of β -Thalassemia in Turkey. *American Journal of Hematology* 1998; 57:215-220.
22. Cao A, Saba L, Galanello MD, Rosatelli MC. Molecular diagnosis and carrier screening for beta thalassemia, *JAMA* 1997; 278: 1273-1277.
23. Fessas P. Inclusions of hemoglobin in erythroblasts and erythrocytes of thalassemia. *Blood* 1963; 21:21.
24. Nathan DG. Thalassemia as a proliferative disorder. *Medicine* 1964; 43:779.
25. Engle MA. Cardiac involvement in Cooley's anemia. *Ann N Y Acad Sci* 1964; 119:694.
26. Borgna-Pignatti C, Rugolotto S, De Stefano P, Piga A, Di Gregorio F, Gamberini MR, Sabato V, Melevendi C, Cappellini MD, Verlato G. Survival and disease complications in thalassemia major. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 850: 227-31.
27. Yeşilipek MA. Talasemi Tedavisindeki Gelişmeler. *Güncel Pediatri* 2005; 3:47-48.
28. Wolman IJ. Transfusion therapy in Cooley's Anemia: Growth and Health as related to Long-range Hemoglobin levels. A progress report. *Ann N Y Acad Sci* 1964; 119: 736-47.

29. Aydınok Y. Clinical management of thalassemia. *Turkish Journal of Hematology* 2006; 23:13-21.
30. Piomelli S, Karpatkin MH, Arzanian M, Zamani M, Becker MH, Geneiser N, Danoff SJ, Kuhns WJ. Hypertransfusion regimen in patients with Cooley's anemia. *Ann N Y Acad Sci* 1974; 232: 186-92.
31. Propper RD, Button LN, Nathan DG. New approaches to the transfusion management of thalassemia. *Blood* 1980; 55: 55-60.
32. Canatan D. Talasemi trasfüzyonunda Prensipiler. In: *Talasemi ve Hemoglobinopatiler Tanı ve Tedavi* . Canatan D, Aydınok Y (eds). Retma Matbaa Ltd. Antalya, 2007,s: 101-107.
33. Michail-Merianou V, Pamphili-Panousopoulou L, Piperi-Lowes L, Pelegrinis E, Karaklis A. Alloimmunization to red cell antigens in thalassemia: comparative study of usual versus better-match transfusion programmes. *Vox Sang* 1987; 52: 95-8.
34. Collins AF, Gonçalves-Dias C, Haddad S, Talbot R, Herst R, Tyler BJ, Zuber E, Blanchette VS, Olivieri NF. Comparison of a transfusion preparation of newly formed red cells and standard washed red cell transfusions in patients with homozygous beta-thalassemia. *Transfusion* 1994; 34: 517-20.
35. Berdoukas VA, Kwan YL, Sansotta ML. A study on the value of red cell exchange transfusion in transfusion dependent anaemias. *Clin Lab Haematol* 1986; 8: 209-20.
36. Kresie L. Artificial blood: an update on current red cell and platelet substitutes. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2001; 14: 158-61.
37. Aydınok Y. Talasemide demir yükü ve şelasyon. In: *Talasemi ve Hemoglobinopatiler Tanı ve Tedavi* . Canatan D, Aydınok Y (eds). Antalya;Retma Matbaa Ltd. 2007; 159-173.
38. Porter JB, Jaswon MS, Huehns ER, East CA, Hazell JW. Desferrioxamine ototoxicity: evaluation of risk factors in thalassaemic patients and guidelines for safe dosage. *Br J Haematol* 1989; 73: 403-9.
39. Origa R, Bina P, Agus A, Crobu G, Defraia E, Dessì C, Leoni G, Muroli PP, Galanello R. Combined therapy with deferiprone and desferrioxamine in thalassemia major. *Haematologica* 2005 ; 90: 1309-14.
40. Cohen AR, Galanello R, Piga A, Dipalma A, Vullo C, Tricta F. Safety profile of the oral iron chelator deferiprone: a multicentre study. *Br J Haematol* 2000; 108: 305-12.

41. Wonke B, Wright C, Hoffbrand AV. Combined therapy with deferiprone and desferrioxamine. *Br J Haematol* 1998; 103: 361-4.
42. Breuer W, Ermers MJ, Pootrakul P, Abramov A, Hershko C, Cabantchik ZI. Desferrioxamine-chelatable iron, a component of serum non-transferrin-bound iron, used for assessing chelation therapy. *Blood* 2001; 97(3):792-8.
43. Glickstein H, El RB, Link G, Breuer W, Konijn AM, Hershko C, Nick H, Cabantchik ZI. Action of chelators in iron-loaded cardiac cells: Accessibility to intracellular labile iron and functional consequences. *Blood* 2006; 108(9):3195-203.
44. Graziano JH, Piomelli S, Hilgartner M, Giardina P, Karpatkin M, Andrew M, LoIacono N, Seaman C. Chelation therapy in beta-thalassemia major. III. The role of splenectomy in achieving iron balance. *J Pediatr* 1981; 99(5):695-9.
45. Anak S, Yeşilipek A. Talasemi'de kemik iliği transplantasyonu. In: Talasemi ve Hemoglobinopatiler Tanı ve Tedavi . Canatan D, Aydınok Y (eds). Antalya; Retma Matbaa Ltd. 2007, s:231-242.
46. Kan YW, Golbus MS, Klein P, Dozy AM: Successful application of prenatal diagnosis in a pregnancy at risk for homozygous beta thalassemia. *N Eng J Med* 1975; 292: 1096-1099.
47. Baykal Y, Gök F, Erikçi S. Demir, serbest radikaller ve oksidatif hasar. *Sendrom* 2002; 14(1): 94-100.
48. Bayir H, Kagan VE, Tyurina YY et al. Assessment of antioxidant reserves and oxidative stress in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children. *Pediatric Research* 2002; 51:571-578.
49. Cirak B, Inci S, Palaoglu S, et al. Lipid peroxidation in cerebral tumors. *Clinica Chimica Acta* 2003; 327: 103-107.
50. Minnet C. Çocukluk çağında B12 vitamin eksikliğinin oksidan-antioksidan sistem ve DNA hasarı ile ilişkisi. Uzmanlık tezi, 2006.
51. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2002; 33: 110-118.
52. Jensen SJK, Oxidative stress and free radicals. *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, 2003; 666: 387-392.
53. Akkuş I. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya; Mimoza yayınları, 1995.

54. Cross CE, Halliwell B, Borish ET. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987; 107: 526 - 545.
55. Yamamoto Y. Role of active oxygen species and antioxidants in photoaging. *Journal of Dermatological Science* 2001; 27: 1-4.
56. Stadtman ER. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 315-25.
57. Yigit A, Yurdakök M. Yeni doğanlarda serbest radikallere bağlı hastalıklar. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 1997;39:749-765.
58. Shi X, Dong Z, Huang C et al. The role of hydroxyl radical as a messenger in the activation of nuclear transcription factor NF-kappaB. *Mol Cell Biochem* 1999; 194: 63-70.
59. Çelik H. Malarya (Sıtma) hastalarında oksidatif stres ve mononükleer lenfosit DNA hasarının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, 2005.
60. Mead J. Free radical mechanisms in lipid peroxidation and prostaglandins. *Free radical in molecular biology. J. Aging and Disease* 1984; 65: 53–66.
61. Braugher M, Chose L, Pregenter F. Oxidation of ferrous iron during peroxidation of lipid substrates. *J. Biochemica and Biohysica Acta* 1987; 921: 457–64.
62. Burton G, Traber M. Antioxidants action of carotenoids. *J. Nutr* 1989; 119: 109–111.
63. McCord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clinical Biochemistry* 1993; 26: 351-357.
64. Repine JE, Bast A, Lankhorst I. Oxidative stresses in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 341–357.
65. Reznick AZ, Cross CE, Hu ML, Suzuki YJ, Khwaja S, Safadi A. Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation. *J. Biochem* 1992; 286(35): 607–11.
66. Bowry VW, Mohr D, Cleary J, et al. Prevention of tocopherol-mediated peroxidation in ubiquinol-10-free human low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1995; 270: 5756-63.
67. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 2003; 17: 1195-1214.
68. Evans MD, Cooke MS. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *Bioessays* 2004; 26: 533-542.

69. Totter JR. Proc. Spontaneous cancer and its possible relationship to oxygen metabolism. *Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 1763–7.
70. Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Ravanat JL. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res* 2003; 531: 5-23.
71. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3 ed., London; O.U. Press. 1999.
72. Milligan JR, Ward JF. Yield of single-strand breaks due to attack on DNA by scavenger-derived radicals. *Radiat Res* 1994. 137: 295-299.
73. Zastawny TH, Altman SA, Randers-Eichhom L, Madurawe R, Lumpkin JA, Dizdaroglu M, Rao G. DNA base modifications and membrane damage in cultured mammalian cells treated with iron ions. *Free Rad Biol Med* 1995; 18: 1013-1022.
74. Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters* 1991; 281: 9-19.
75. Halliwell B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: Measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutat Res* 1999; 443:37-52.
76. Scandalios JG. The rise of ROS. *TRENDS in Biochemical Sciences* 2002; 27: 483-486.
77. Yeşilkaya A, Altınayak R, Korgun DK. The antioxidant effect of free bilirubin on cumenehydroperoxide treated human leukocytes. *Gen Pharmacol* 2000; 35:17-20.
78. Makarov VG, Makarova M, Selezneva AI. Studying the mechanism of antioxidant effect of vitamins and flavonoids. *Vopr Pitan* 2005; 74:10-3.
79. Minetti M, Mallozzi C, Di Stasi AM, et al. Bilirubin is an effective antioxidant of peroxynitrite-mediated protein oxidation in human blood plasma. *Arch Biochem Biophys* 1998; 352:165-74.
80. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, et al. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 1987; 235:1043-6.
81. Stocker R, Antioxidant activities of bile pigments. *Antioxid Redox Signal* 2004; 6: 841-9.
82. De Boer J, Hoeijmakers J. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 2000; 21: 453-460.

83. Romay C, Pascual C, Lissi EA. The reaction between ABTS radical cation and antioxidants and its use to evaluate the antioxidant status of serum samples. *Braz J Med Biol Res* 1996; 29: 175-183.
84. Kattamis C, Kattamis AC. Oxidative stress disturbances in erythrocytes of β -thalassemia. *Pediatr Hematol Oncol* 2001; 18: 85-88.
85. Clemens MR. Antioxidant therapy in hematological disorders. In: *Antioxidants in Therapy and Preventive Medicine*. Emeritetal (ed), New York: Plenum Press, 1990:423-433.
86. Scott MD, Van den Berg JJM, Repka T, et al. Effect to excess β -hemoglobin chains on cellular and membrane oxidation in model β -thalassemic erythrocytes. *J Clin Invest* 1993; 91:1706-1712.
87. Andrews NC, Bridges KR. Disorders of Iron Metabolism and Sideroblastic Anemia. In: Nathan DG, Oski FA, ed. *Hematology of Infancy and Childhood*, 5th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1998: 424-426.
88. Miller M, Hutchins GM. Hemochromatosis, multiorgan hemosiderosis, and coronary artery disease. *JAMA* 1994; 272: 231-233.
89. Hershko C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. *Sem Hematol* 1989; 26: 277-285.
90. Anderson AC. Iron poisoning in Children. *Curr Opin Pediatr* 1994; 6:289-294.
91. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence. *Lancet* 1994; 334: 721-724.
92. Agil A, Fuller CJ, Jialal I. Susceptibility of plasma to ferrous iron/hydrogen peroxide-mediated oxidation: demonstration of a possible Fenton reaction. *Clin Chem* 1995, 41: 220-225.
93. Asad SF, Singh A, Ahmad A, et al. Prooxidant and antioxidant activities of bilirubin and its metabolic precursor biliverdin: a structure-activity study. *Chem Biol Interact* 2001; 137: 59-74.
94. Hershko C, Konijn AM, Link G. Iron chelators for thalassaemia. *Br J Haematol* 1998; 101:399-406.
95. Seymen O, Seven A, Hatemi S, Hatemi H, Candan G, Yiğit G. Lipid peroxidation in experimental hyperthyroidism: effects of iron supplementation. *Med Sci Res* 1995; 23: 695-696.

96. Rachmilewitz EA, Kornberg A, Acker M. Vitamin E deficiency due to increased consumption in β -thalassemia and in Gaucher's disease. *Ann NY Acad Sci* 1982; 393: 336-347.
97. Miniero R, Canducci E, Ghigo D, et al. Vitamin E in beta-thalassemia. *Acta Vitaminol Enzymol* 1982; 4:21-25.
98. Meral A, Tuncel P, Surmen-Gur E, et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in beta-thalassemia. *Pediatr Hematol Oncol* 2000; 17:687-693.
99. Yenchitsomanus P, Wasi P. Increased erythrocyte superoxide dismutase activities in β -thalassaemia/haemoglobin H diseases. *J Clin Pathol* 1983; 36: 329-333.
100. Laksmiawati DR, Handayani S, Udyaningsih-Freisleben SK, et al. Iron status and oxidative stress in beta-thalassemia patients in Jakarta. *Biofactors* 2003; 19: 53-62.
101. Shires TK. Iron-induced DNA damage and synthesis in isolated rat liver nuclei. *Biochem J* 1982;205:321-329.
102. Hruszkewycz AM. Evidence for mitochondrial DNA damage by lipid peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;153: 191-197.
103. Mello Filho AC, Meneghini R. In vivo formation of single strand breaks in DNA by hydrogen peroxide is mediated by the Haber- Weiss reaction. *Biochim Biophys Acta* 1984; 781: 56-63.
104. Starke PE, Farber JL. Ferric iron and superoxide ions are required for the killing of cultured hepatocytes by hydrogen peroxide: evidence for the participation of hydroxyl radicals formed by an iron-catalyzed Haber-Weiss reaction. *J Biol Chem.* 1985;260: 10099-10104.
105. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990; 186:1-85.
106. Park J-W, Floyd RA. Lipid peroxidation products mediate the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA. *Free Radic Biol Med* 1992; 12: 245-250.
107. Bradbear RA, Bain C, Siskind V, et al. Cohort study of internal malignancy in genetic hemochromatosis and other chronic nonalcoholic liver diseases. *J Natl Cancer Inst* 1985; 75: 81-84.
108. Niederau C, Fischer R, Sonnenberg A, et al. Survival and causes of death in cirrhotic and in noncirrhotic patients with primary hemochromatosis. *N Engl J Med* 1985;313:1256-1262.

109. Britton RS, Leicester KL, Bacon BR. Iron Toxicity and Chelation Therapy. *Int J Hematol* 2002; 76: 219-228.
110. Singh NP, Danner DB, Tice RR, Pearson JB, Brant LJ, Schneider EL. DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *J. Mutat Res* 1990; 237:123-30.
111. Östling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 123: 291-8.
112. Kocyigit A, Keleş H, Selek S, et al. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis. *J. Mutation Res* 2005. 124: 47-59.
113. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175 : 184–191.
114. Collins AR, Dobson VL, Dusinska M, Kennedy G, Stetina R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res* 1997;375:183–193.
115. Faust F, Kassie F, Knasmüller S, Boedecker RH, Mann M, Mersch-Sundermann V. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res* 2004;566:209–229.
116. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *J Clin Biochemistry* 2004; 37: 112-9.
117. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *J Clin Biochemistry* 2005; 47: 119-29.
118. Arab K, Steghnes JP. Plasma lipid hydroperoxides measurement by an automated xylenol orange method. *Anal Biochem* 2004; 325: 158–63.
119. Naithani R, Chandra J, Bhattacharjee J, Verma P, Narayan S. Peroxidative Stress and Antioxidant Enzymes in Children with β -Thalassemia Major. *Pediatr Blood Cancer* 2006;46: 780–785.
120. Olivieri NF, Weatherall DJ. Thalassemias. In: Arceci RJ, Hann IM, Smith OP (eds), *Pediatric Hematology*, third ed. Massachusetts: Blackwell Publishing Ltd, 2006; 281-301.
121. Olivieri NF. The beta-thalassemias. *N Eng J Med* 1999; 341:99-109.
122. Pavlova LE, Savov VM, Petkov HG, Charova IP. Oxidative stress in patients with beta-thalassemia major. *Prilozi* 2007; 28(1):145-54.

123. Brunori M, Falcino G, Fioreti E. Formation of superoxide in autooxidation of isolated alpha and beta chains of human haemoglobin and its involvement in hemichrome precipitation. *Eur J Bioch* 1975; 53: 99-104.
124. Schrier SL, Centis F, Verneris M, Ma L, Angelucci E. The role of oxidant injury in the pathophysiology of human thalassemias. *Redox Rep* 2003; 8(5):241-5.
125. Dhawan V, Ratan Kumar K, Marwaha RK, Ganguly NK. Antioxidant Status in Children with Homozygous β -Thalassemia. *Indian Pediatrics* 2005;42(17); 1141-1145.
126. Rachmilewitz EA. The role of intracellular hemoglobin precipitation, low MCHC, and iron overload on red blood cell membrane peroxidation in thalassemia. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1976; 12: 122-13.
127. Cheng M, Ho H, Tseng H, et al. Antioxidant deficit and enhanced susceptibility to oxidative damage in individuals with different forms of β -thalassaemia. *Br J Haematol* 2005;128:119–127.
128. McCord JM. Iron, free radicals, and oxidative injury. *Semin Hematol* 1998; 35(1): 5-12.
129. Kassab-Chekir A, Laradi S, Ferchichi S, et al. Oxidant, antioxidant status and metabolic data in patients with beta-thalassemia. *Clinica Chimica Acta* 2003; 338:79–86.
130. Şimşek F, Öztürk G, Kemahlı S, Erbaş D, Hasanoglu A. Oxidant and antioxidant status in beta thalassemia major patients. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 2005; 58:34-38.
131. Miniero R, Canducci E, Ghigo D. Vitamin E in beta-thalassemia. *Acta Vitaminol Enzymol* 1982; 4: 21-25.
132. Suthutvoravut U, Hathirat P, Sirichakwal P. Vitamin E status, glutathione peroxidase activity and the effect of vitamin E supplementation in children with thalassemia. *J Med Assoc Thai* 1993; 76: 146-152.
133. Giardini O, Cantani A, Donfrancesco A. Biochemical and clinical effects of vitamin E administration in homozygous beta thala-ssemia. *Acta Vitaminol Enzymol* 1985; 7: 55-60.
134. Chakraborty D, Bhattacharyya M. Antioxidant defense status of red blood cells of patients with β -thalassemia and E β -thalassemia. *Clinica Chimica Acta* 2001;305:123–129.
135. Cooper RA, Kimball DB, Droucher JR. Role of spleen in membrane conditioning and hemolysis of spur cells in liver disease. *N Eng J Med* 1974; 290: 1279.

136. Rachmilewitz EA, Shifter A, Kahane I. Vitamin E deficiency in beta thalassemia major: Changes in hematological and bio-chemical parameters after therapeutic trial with alpha-tocopherol. *Am J Clin Nutr* 1979; 32: 1850-1858.
137. Worwood M, Cragg SJ, Jacobs A, McLaren C, Ricketts C, Economidou J. Binding of serum ferritin to concanavalin A: patients with homozygous beta thalassaemia and transfusional iron overload. *Br J Haematol* 1980; 46: 409-416.
138. Olivieri NF, Brittenham GM. Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia. *Blood* 1997; 89: 739-761.
139. Brittenham GM, Cohen AR, McLaren CE et al. Hepatic iron stores and plasma ferritin concentration in patients with sickle cell anemia and thalassemia major. *Am J Hematol* 1993;42:81-85.
140. Angelucci E, Brittenham GM, McLaren CE et al. Hepatic iron concentration and total body iron stores in thalassemia major. *N Eng J Med* 2000; 343: 327-331.
141. Brittenham GM, Farrell DE, Harris JW et al. Magnetic-susceptibility measurement of human iron stores. *N Eng J Med*. 1982; 307: 1671-1675.
142. Anderson LJ, Holden S, Davis B et al. Cardiovascular T2-star (T2*) magnetic resonance for the early diagnosis of myocardial iron overload. *Eur Heart J* 2001; 22:2171-2179.
143. Perifanis V, Tziomalos K, Tsatra I, et al.: Prevalence and severity of liver disease in patients with thalassemia major. A single-institution fifteen-year experience. *Hematologica*, 2005; 90:1136-1138.
144. Goldfarb AW, Rachmilewitz EA, Eisenberg S. Abnormal low and high density lipoproteins in homozygous beta thalassaemia. *Br J Haematol* 1991;79(3):481 –6.
145. Al-Quobaili FA, Abou Asali IE. Serum levels of lipids and lipoproteins in Syrian patients with beta-thalassemia major. *Saudi Med J* 2004 ;25(7):871-5.
146. Papanastasiou DA, Siorokou T, Haliotis FA. beta-Thalassaemia and factors affecting the metabolism of lipids and lipoproteins. *Haematologia (Budap)*. 1996; 27(3):143-53.
147. Canatan D, Aslan İ, Oğuz N, Balta N, Çoşan R, Karadoğan C. Talasemi majorlü hastalarda serum lipid değerleri. *Sleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2001;8:4-5.
148. Walter PB, Fung EB, Killilea DW, et al. Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with b-thalassaemia or sickle cell disease. *British Journal of Haematology* 2006;135:254–263.

149. Walter PB, Knutson MD, Paler-Martinez A, et al. Iron deficiency and iron excess damage mitochondria and mitochondrial DNA in rats. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99: 2264-2269.
150. Walles SAS, Erixson K. Single-strand breaks in DNA of various organs of mice induced by methyl methanesulfonate and dimethylsulfoxide determined by the alkaline unwinding technique. *Carcinogenesis* 1984;5: 319-322.
151. Hartley JA, Gibson NW, Zwelling LA, Yuspa SH. Association of DNA strand breaks with accelerated terminal differentiation in mouse epidermal cells exposed to tumor promoters. *Cancer Res* 1985; 45: 4864-4870.
152. Faux SP, Francis JE, Smith AG, Chipman JK. Induction of 8- hydroxydeoxyguanosine in Ah-responsive mouse liver by iron and Aroclor 1254. *Carcinogenesis* 1992; 13:247-250.
153. Kang JO, Jones C, Brothwell B. Toxicity associated with iron overload found in hemochromatosis: possible mechanism in a rat model. *Clin Lab Sci* 1998; 11:350-354.
154. Okada S. Iron-induced tissue damage and cancer: the role of reactive oxygen species-free radicals. *Pathol Int* 1996;46: 311-332.
155. Toyokuni S. Iron-induced carcinogenesis: the role of redox regulation. *Free Radic Biol Med* 1996;20: 553-566.
156. Zhang D, Okada S, Yu Y, Zheng P, Yamaguchi R, Kasai H. Vitamin E inhibits apoptosis, DNA modification, and cancer incidence induced by iron-mediated peroxidation in Wistar rat kidney. *Cancer Res* 1997; 57: 2410-2414.
157. Yamada M, Awai M, Okigaki T. Rapid in vitro transformation system for liver epithelial cells by iron chelate, Fe-NTA. *Cytotechnology* 1990; 3: 149-156.
158. Carmichael PL, Hewer A, Osborne MR, Strain AJ, Phillips DH. Detection of bulky DNA lesions in the liver of patients with Wilson's disease and primary haemochromatosis. *Mutat Res* 1995;326: 235-243.